

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局



(43)国際公開日  
2004年10月14日 (14.10.2004)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 2004/087210 A1

(51)国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 45/00, 39/395, A61P 37/06, C07K 16/18, 16/46, C12P 21/08, C12Q 1/02

(YAMAGUCHI, Yasunori) [JP/JP]; 〒1508011 東京都渋谷区神宮前6丁目26番1号 麒麟麦酒株式会社 医薬カンパニー内 Tokyo (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP2004/004698

(74)代理人: 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo (JP).

(22)国際出願日: 2004年3月31日 (31.03.2004)

(81)指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25)国際出願の言語: 日本語

(84)指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:  
特願2003-095765 2003年3月31日 (31.03.2003) JP

特願2003-413786 2003年12月11日 (11.12.2003) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 麒麟麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1048288 東京都中央区新川二丁目10番1号 Tokyo (JP).

添付公開書類:  
— 國際調査報告書

(71)出願人および

(72)発明者: 益山純一 (MASUYAMA, Junichi) [JP/JP]; 〒3230829 栃木県小山市東城南4-15-8 Tochigi (JP).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 渡邊智子 (WATANABE, Tomoko) [JP/JP]; 〒3701295 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内 Gunma (JP). 相馬良明 (SOMA, Yoshiaki) [JP/JP]; 〒3701295 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内 Gunma (JP). 山口泰範

(54)Title: METHOD OF INDUCING DIFFERENTIATION AND PROLIFERATING REGULATORY T CELL BY ANTI-CD52 ANTIBODY AND MEDICINAL COMPOSITION THEREFOR

(54)発明の名称: 抗CD52抗体による調節性T細胞分化誘導・増殖方法およびそのための医薬組成物

(57)Abstract: It is intended to provide a method of inducing the differentiation and/or promoting the proliferation of regulatory T cells; a method of inhibiting vessel flow-mediated endothelial cell migration of immune cells; immunosuppression methods using these methods; and a medicinal composition to be used in these methods. Namely, a method of inducing the differentiation and/or promoting the proliferation of regulatory T cells by treating CD52-expressing T cells with a CD52 agonist containing anti-CD52 antibody, a method of inhibiting vessel flow-mediated endothelial cell migration of immune cells, and immunosuppression methods using these methods.

(57)要約: 本発明は、調節性T細胞の分化誘導および/または増殖促進方法、免疫細胞の経血管内皮細胞遊走抑制方法、ならびにこれらの方による免疫を抑制する方法、ならびにこれらの方法に用いるための医薬組成物を提供することを目的とする。抗CD52抗体を含むCD52アゴニストをCD52発現T細胞に作用させることによる、調節性T細胞の分化誘導および/または増殖促進方法、免疫細胞の経血管内皮細胞遊走抑制方法、ならびにこれらの方法による免疫を抑制する方法が提供される。

WO 2004/087210 A1

## 明細書

### 抗 CD52 抗体による調節性 T 細胞分化誘導・増殖方法およびそのための医薬組成物

#### 技術分野

本発明は、新規の、免疫を抑制する方法、特に調節性 T 細胞（抑制性 T 細胞と呼ばれる場合もある）の分化誘導・増殖促進を誘導することにより免疫を抑制する方法、および該方法に使用するための医薬組成物に関する。

#### 背景技術

本発明者らは、4C8 モノクローナル抗体（4C8mAb）が、ヒト T 細胞が血管内皮細胞に接着した後の、内皮下への遊走を阻害するモノクローナル抗体であることを発見した (Masuyama, J. et al., (1999) J. Exp. Med., 189, 979)。T 細胞が炎症局所などの末梢組織に移行するためには、血管内皮細胞にインテグリン分子を介して強固に接着した後に細胞運動に適した形態に変化し、血管内皮細胞間隙をすり抜けて遊走する過程が必要である。血管内皮細胞に接着した T 細胞全てが内皮下へ遊走するのではなく、CD4 陽性 CD45RO 陽性 CD26 強陽性の活性化メモリー T 細胞が選択的に遊走することが知られている。即ち、4C8mAb は T 細胞の血管内皮細胞への接着は抑制せずに、T 細胞サブセット選択的な内皮下への遊走を特異的に抑制するモノクローナル抗体である。

さらに、4C8mAb の新たな機能として調節性 T 細胞の誘導能が報告された (Masuyama, J. et al., (2002) J. Immunol., 169, 3710)。単独では T 細胞活性化能をもたない程度の低濃度の CD3 アゴニストで T 細胞を刺激するときに、同時に適切な副刺激を加えることで T 細胞を活性化させることができる。副刺激は CD3 アゴニストの活性化能の亢進を行うのみならず、活性化後の T 細胞の機能にも大きな影響を与える。CD3 アゴニストとして抗 CD3 抗体である OKT3 を用いたとき、4C8mAb による刺激は副刺激として機能し、CD4 陽性 T 細胞を活性化、増殖させた。さらに、CD3、4C8mAb の同時刺激による活性化後の細胞は *in vitro* においてポリクローナル刺激による CD4 陽性 T 細胞の増殖に対して抑制活性を示し、調

節性 T 細胞が誘導されていることが判った。

### 1. 調節性 T 細胞

種々の病原体に対する生体防御のシステムとしての免疫系の中心的役割を担う細胞群の一つに T 細胞がある。T 細胞は大別して CD4 陽性のヘルパー T 細胞と CD8 陽性の細胞傷害性 T 細胞に分けられるが、前者は特に抗原刺激後の特定の分化成熟段階でのサイトカイン産生パターンによって、主に IFN- $\gamma$  を産生する Th1 細胞、 IL-4 を産生する Th2 細胞などに分類可能である。一般的に前者は細胞性免疫、後者は液性免疫として生体防御に深く関与している。免疫応答はこのような性質の異なる T 細胞の働きによって巧妙なバランスのもとに病原体の排除や感染抵抗性の獲得に深く関与している。通常健全な免疫応答においては外来の非自己抗原に対してはそれらを排除する機構が働き、生体を形成する自己抗原に対しては免疫学的寛容が成立しており排除機構が働かないことが知られている。しかしながら自己抗原に対する過剰な免疫応答が働くことによって自己免疫疾患が生ずる。このように自己抗原に対する免疫学的寛容は絶対的なものではないが、T 細胞レベルにおいても種々の免疫学的寛容が誘導される仕組みが分かっている。一つは、中枢寛容 (central tolerance) と呼ばれる胸腺における自己反応性 T 細胞クローンの排除の機構 (Kisielow, P. et al., 1988. Nature. 333:742-746.)、他方は末梢寛容 (peripheral tolerance) と呼ばれる機構による自己反応性 T 細胞の胸腺外での制御である。後者には、細胞死の誘導あるいは自己抗原に対する不応答性 (anergy) の誘導 (Rocha, B., and H. von Boehmer. 1991. Science. 251:1225-1228.; Jenkins, M.K., and R. H. Schwartz. 1987. J. Exp. Med. 165:302-319.) と共に、調節性 T 細胞 (regulatory T cell) による能動的な抑制 (Shevach, E.M. 2000. Annu. Rev. Immunol. 18:423-449.) の機構が知られている。調節性 T 細胞とは、近年提唱された T 細胞の新たな概念であり、他の T 細胞に対して抑制的な作用を有することによって定義付けられる。免疫応答は巧妙なバランスのもとに成り立っており、例えば上述の Th1 細胞および Th2 細胞はお互いにそれぞれの免疫応答に拮抗的に働き、一方が他方に対する調節性 T 細胞として作用することが知られるようになってきた。反面、調節性 T 細胞としての細胞集団の存在の検証とその性状解析については免疫学の近年の歴史におい

ても多くの議論があるところである。このような調節性T細胞は *in vitro* または *in vivo* において特定の免疫応答を抑制または調節する機能を有する細胞として研究され、細胞表面マーカー、産生するサイトカインの種類や抑制・調節の機構などによって種々の細胞集団として報告されてきている (Roncarolo, M. G., and M. K. Levings. 2000. *Curr. Opinion. Immunol.* 12:676-683.)。

これらの調節性T細胞の中でも近年最もよく研究されている細胞集団は、以下に述べる CD4 陽性 CD25 陽性であることをマーカーとする T 細胞集団であり、主にマウスおよびラットなどのヒト以外の生物種で研究してきた。即ち、正常マウスまたはラットの CD4 陽性脾臓細胞から CD25 陽性、RT6.1 陽性 (ラットの成熟 T 細胞の大部分に発現)、CD5 強陽性、または CD45RB 弱陽性 (マウス) 若しくは CD45RC 弱陽性 (ラット) の細胞を除去して、残りの T 細胞を免疫不全の動物に移入することで臓器特異的自己免疫疾患が誘導されることが明らかとなった。これまでこのような調節性 T 細胞特異的なマーカーは見出されておらず、上記のマーカーは調節性 T 細胞の機能とは直接関連付けられない、細胞が活性化されている状態、抗原刺激を受けた状態、免疫学的記憶状態にあることを表すマーカーにしか過ぎない。しかしながら、免疫不全動物に臓器特異的自己免疫疾患を誘導する機能のみならず、逆に特定の細胞集団を移入することで自己免疫疾患および自己免疫性炎症を抑制する機能を有することを指標として調節性 T 細胞集団の解析が進み、CD4、CD25 共に陽性である T 細胞集団が調節性 T 細胞のマーカーとなり得ることが知られるに至った (Sakaguchi, S., et al., 1985. *J. Exp. Med.* 161:72; Itoh, M., et al., 1999. *J. Immunol.* 162:5317-5326; Sakaguchi, S. et al., 1995. *J. Immunol.* 155:1151-1164; Asano, M. et al., 1996. *J. Exp. Med.* 184:387-396; Read, S. et al., 2000. *J. Exp. Med.* 192:295-302; Salomon, B. et al., 2000. *Immunity.* 12:431-440; Stephens, L. A., and D. Mason. 2000. *J. Immunol.* 165:3105-3110.)。

上記のようにマウスおよびラットにおいて、CD4 陽性 CD25 陽性の調節性 T 細胞が同定された一方で、ヒトにおける同様の細胞の存在はようやく 2001 年になって複数のグループから報告されたに過ぎない (Jonuleit, H. et al., 2001. *J. Exp. Med.* 193:1285-1294; Levings, M. K. et al., 2001. *J. Exp. Med.* 193:1295-1301;

Dieckmann, D. et al., 2001. J. Exp. Med. 193:1303-1310; Taama, L. S. et al., 2001. Eur. J. Immunol. 31:1122-1131; Stephens, L. A. et al., 2001. Eur. J. Immunol. 31:1247-1245; Baecher-Allan, C. et al., 2001. J. Immunol. 167:1245-1253.)。これらの報告はマウスで知られている CD4 および CD25 の発現を指標にヒト末梢血から分離された細胞集団を用いて種々の細胞表面マーカー、細胞の活性化刺激に対する不応答性 (anergy)、產生されるサイトカインの種類、*in vitro* における通常 T 細胞の増殖抑制機能およびその機構などの点においてマウスでの報告と同等であることを根拠としている。即ち、ヒト末梢血から分離された CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞は、CD45RO 陽性のメモリー T 細胞マーカーを発現しており、CD4 陽性 CD25 陰性 T 細胞と比較して HLA-DR などの活性化マーカーの発現が高い。また細胞内には定常的に CTLA-4 を発現しており、刺激によりその発現が上昇する。更に抗 CD3 抗体刺激、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体による刺激、同種異系の成熟樹状細胞 (allogeneic mature DC) による刺激などでは、CD4 陽性 CD25 陽性の調節性 T 細胞の DNA 合成およびサイトカインの產生は見られず、抗原刺激に対する不応答状態 (anergy) となっている。抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体による刺激に IL-2、IL-4、IL-15 などのサイトカインを加えることで、CD4 陽性 CD25 陽性 調節性 T 細胞の DNA 合成能は高まるが、CD4 陽性 CD25 陰性 T 細胞のそれには及ばない。CD4 陽性 CD25 陽性 調節性 T 細胞存在下に CD4 陽性 CD25 陰性 T 細胞を抗 CD3 抗体または同種異系の成熟樹状細胞 (allogeneic mature DC) によって刺激した場合、CD4 陽性 CD25 陽性 調節性 T 細胞非存在下と比較して CD4 陽性 CD25 陽性 調節性 T 細胞細胞数依存的な増殖抑制作用が見られる。マウスに比較して低いものの、CD4 陽性 CD25 陽性調節性 T 細胞は IL-10、TGF  $\beta$  1 のような抑制性のサイトカインを產生する能力があるが、CD4 陽性 CD25 陰性 T 細胞に対する増殖抑制作用は、これらサイトカインに対する中和抗体では解除されないこと、抑制作用には CD4 陽性 CD25 陰性 T 細胞と CD4 陽性 CD25 陽性調節性 T 細胞の直接的細胞間接触が必要であることが報告されている。マウス、ラットおよびヒトにおいて CD4 陽性 CD25 陽性調節性 T 細胞の存在が報告され性状解析が進んではいるものの、これら細胞の詳細な分化機構および抑制作用機構の解明は途上にあり、特異的なマーカーも見出されていないのが現状である。

またマウスおよびヒトにおいて、IL-10 存在下での同種異系の (allogeneic) 抗原刺激や同種異系の未成熟樹状細胞 (allogeneic immature DC) による繰り返し刺激によって誘導される調節性 T 細胞についても報告されている (Groux, H. et al., 1997. *Nature.* 389:737-742; Jonuliet, H. et al., 2000. *J. Exp. Med.* 192:1213-1222.)。これらの細胞は、Th1、Th2 細胞とは異なり大量の IL-10 を產生するものの、TGF- $\beta$  1、IFN- $\gamma$ 、IL-5 の產生は高くなく、低レベルの IL-2 を產生し、IL-4 を產生しないことを特徴としており、Tr1 細胞と呼ばれている。Tr1 細胞も CD4 陽性 CD25 陽性 調節性 T 細胞と同様に anergic であるが、T 細胞抑制機構は產生される IL-10 や TGF- $\beta$  1 によって一部説明可能である。しかしながら、Tr1 細胞と CD4 陽性 CD25 陽性調節性 T 細胞が全く異なる T 細胞サブセットであるのか、或いは分化活性化段階の異なる同一の細胞であるかについては不明な点が多い。

マウスおよびラットで知られている調節性 T 細胞マーカーである CD4、CD25 の発現を指標として、ヒトにおいても末梢血などから CD4 陽性、CD25 陽性の T 細胞を分離して見たところ、マウスやラットで知られているその他の細胞表面マーカーと機能と照らし合わせて同様であることが確認された。このことから、ヒトにおける CD4 陽性、CD25 陽性の調節性 T 細胞の存在が示唆された。

これら細胞は、末梢血 CD4 陽性 T 細胞の 5~10%を占めるに過ぎない希少細胞集団である上に、活性化・増殖刺激に対して不応答状態である。この場合、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体による刺激に IL-2、IL-4 または IL-15 などのサイトカインを加えることで細胞増殖を促すことは可能である。しかしながら、細胞数を増幅させヒトに移入するなどの臨床応用には十分なレベルではない。

調節性 T 細胞は、動物実験ではそれら細胞を移入することによって自己免疫疾患に抑制的に働くこと、移植拒絶反応や移植片対宿主病 (GvHD) に抑制的に働くこと (Hara, M. et al., 2001. *J. Immunol.* 166:3789-3796; Taylor, P. A. et al., 2001. *J. Exp. Med.* 193:1311-1317.) から、調節性 T 細胞の免疫抑制作用を利用した細胞医療による自己免疫疾患、臓器移植などにおける治療への応用が考えられる。調節性 T 細胞の増殖を促進する医薬組成物、または患者もしくは別のヒトから採取した末梢血、骨髄細胞を生体外で処理することにより、調節性 T 細胞を

増殖させ、患者の体内に戻す療法の開発が期待されている。

## 2. 4C8 抗原

4C8 抗原は元々ヒト T 細胞が血管内皮細胞に接着した後の内皮下への遊走に関する分子を同定する目的で発見された、免疫系細胞の一部に発現する膜タンパク質である。ヒト T 細胞をマウスに免疫することによって得られたモノクローナル抗体を、T 細胞の *in vitro* 血管外遊走を抑制することを指標にスクリーニングすることにより、4C8 抗原を認識するモノクローナル抗体が取得された (Masuyama, J. et al., 1999. J. Exp. Med. 189:979-989 ; WO99/12972 号公報)。T 細胞が炎症局所などの末梢組織に移行するためには、血管内皮細胞にインテグリン分子を介して強固に接着した後に細胞運動に適した形態に変化し、血管内皮細胞間隙をすり抜けて遊走する過程が必要である。血管内皮細胞に接着した T 細胞全てが内皮下へ遊走するのではなく、CD4 陽性 CD45RO 陽性 CD26 強陽性の活性化メモリーティー T 細胞が選択的に遊走することが知られている。即ち抗 4C8 モノクローナル抗体 (mAb) は T 細胞の血管内皮細胞への接着は抑制せずに、T 細胞サブセット選択的な内皮下への遊走を特異的に抑制する mAb であり、4C8 抗原はこのような遊走に必須の機能分子であると考えられる。4C8mAb により 4C8 抗原の発現を検証したところ、4C8 抗原は CD3 陽性 T 細胞に強く発現し、B 細胞、NK 細胞、単球、好酸球にも発現するが、好中球や内皮細胞には発現しない。4C8mAb による架橋は T 細胞のアクチン重合を促進し細胞形態に極性をもたせるのみならず、細胞運動を刺激する。

## 3. CD52 (campath-1 抗原)

Campath-1 はヒトの骨髓移植片からリンパ球を除去できるラット抗体として Waldmann らによって発見された (Hale, G. et al. (1983) Blood, 62, 873)。Campath-1 の抗原 (CD52) は長く不明であったが、1991 年に Xia らによって新規分子として同定された (Xia, M. Q. et al., (1991) European J. Immunol., 21, 1677)。また、Kirchhoff らによって雄性生殖管上皮特異的分子として同定された HE5 も CD52 と同一の分子であったことが 1993 年に報告されている (Kirchhoff, C. et al., (1993) Molecular Reproduction and Development, 34, 8)。

Campath-1 はリンパ球上に高発現している CD52 に結合し、補体による細胞障害あるいは抗体依存的細胞性細胞傷害 (ADCC) を引き起こすことによってリンパ球を除去する作用を持つ。非常に効率の良いリンパ球除去抗体として、GvHD 軽減を目的とした骨髄移植片からのリンパ球除去や、リンパ腫治療への応用が熱心に研究され、ラット抗体 Campath-1G をヒト化した Campath-1H である Campath (登録商標) (Alemtuzumab) が B 細胞リンパ腫の治療薬として Millennium 社より上市されている (Pangolis GA et al., (2001) *Medical Oncology*, 18, 99)。

しかしながら、その抗原である CD52 の機能についてはあまり明らかになっていない。T 細胞において、CD52 を抗体によって架橋すると、抗原受容体を刺激した場合と類似したタンパク質のリン酸化が見られるという報告 (Hederere RA et al., (2000) *International Immunology*, 12, 505) がある他、抗 CD3 抗体あるいは抗 CD2 抗体に対する刺激に対して CD52 の抗体による架橋が副刺激として作用し、T 細胞の増殖を亢進するという報告がある (Valentin H et al., (1992) *Transplantation*, 54, 97、Rowan WC et al., (1994) *International Immunology*, 7, 69)。しかし CD52 からどのようなシグナルが入っているのか、また CD52 からの副刺激が細胞の機能にどのような影響を与えるのかについては判っていない。

CD52 はリンパ球、単球、マクロファージの他に、前述のように雄性生殖管の上皮にも発現している。雄性生殖管上皮に発現する CD52 は上皮細胞から放出され、精子の成熟の過程で精子表面の糖衣にとりこまれる。CD52 に付加された糖鎖のシアル酸の陰電荷が精子同士の凝集を防ぐ役割を果たしているのではないかと考えられている。また CD52 に対する抗体が不妊の原因となっている例も報告されているが、精子の機能における CD52 の役割などはまだ不明な点が多い (Kirchhoff C et al., (2001) *Cells Tissues Organs*, 168, 93)。

CD52 は 12 アミノ酸からなるペプチドであり、GPI アンカーにより細胞膜に結合している (Xia, M. Q. et al., (1991) *European J. Immunol.*, 21, 1677)。分子自体が非常に小さく、また細胞内ドメインも持たないため、構造から機能を推測することが困難であり、このことが CD52 の機能に関する研究が進んでいないことの一因であると考えられる。

特許文献 2 特許公報 特表平 2-503514

非特許文献 1 Masuyama, J. ら、(2002) J. Immunol., 169, 3710

非特許文献 2 Hale, G. ら、(1983) Blood, 62, 873

非特許文献 3 Xia, M. Q. ら、(1991) European J. Immunol., 21, 1677

非特許文献 4 Kirchhoff, C ら、(1993) Molecular Reproduction and Development, 34, 8

非特許文献 5 Pangolis GA ら、(2001) Medical Oncology, 18, 99

非特許文献 6 Hederere RA ら、(2000) International Immunology, 12, 505

非特許文献 7 Valentin H ら、(1992) Transplantation, 54, 97

非特許文献 8 Rowan WC ら、(1994) International Immunology, 7, 69

非特許文献 9 Kirchhoff C ら、(2001) Cells Tissues Organs, 168, 93

## 発明の開示

本発明は、CD52 を介した調節性 T 細胞の分化誘導および/または増殖促進方法、CD52 を介した免疫細胞の経血管内皮細胞遊走抑制方法、ならびにこれらの方法による免疫を抑制する方法、ならびにこれらの方法に用いるための医薬組成物、特に抗 CD52 抗体を有効成分として含む医薬組成物を提供することを目的とする。

本発明者らは、4C8 抗体により認識される 4C8 抗原について鋭意検討を行い、該抗原が CD52 分子であることを見出した。従来の CD52 についての知見からは、CD52 が活性化 T 細胞の経血管内皮細胞遊走抑制や調節性 T 細胞誘導に関与することは予測できなかった。本発明者らは、さらに抗 CD52 抗体について鋭意検討を行い、それまで B 細胞リンパ腫患者等からのリンパ球除去抗体活性のみ知られていた抗 CD52 抗体が驚くべきことに経血管内皮細胞遊走抑制活性や調節性 T 細胞誘導活性を有していることを新たに見出し、抗 CD52 抗体の活性化 T 細胞の経血管内皮細胞遊走抑制活性や調節性 T 細胞誘導活性を広く免疫療法に利用できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである：

1. 4C8 抗体以外の CD52 アゴニストを有効成分として含有する、免疫抑制のための医薬組成物；

2. 4C8 抗体以外の CD52 アゴニストを有効成分として含有する、調節性 T 細胞の分化誘導および/または増殖促進のための医薬組成物；
3. 調節性 T 細胞が抗原選択性的抑制活性を有するものである、上記 2 記載の医薬組成物；
4. CD3 アゴニストをさらに含む、上記 1 ~ 3 のいずれかに記載の医薬組成物；
5. CD3 アゴニストが抗 CD3 抗体またはそのフラグメントである、上記 4 記載の医薬組成物；
6. 抗 CD3 抗体がヒト化抗体またはヒト抗体である、上記 5 記載の医薬組成物；
7. 4C8 抗体以外の CD52 アゴニストを有効成分として含有する、免疫細胞の経血管内皮細胞遊走抑制のための医薬組成物；
8. CD52 アゴニストが抗 CD52 抗体またはそのフラグメントである、上記 1 ~ 7 のいずれかに記載の医薬組成物；
9. 抗 CD52 抗体がヒト化抗体またはヒト抗体である、上記 8 記載の医薬組成物；
10. 上記ヒト化抗体がラットヒト化抗体 Campath-1H である、上記 9 記載の医薬組成物；
  11. 自己免疫疾患、アレルギー疾患または移植免疫応答の予防または治療のための、上記 1 ~ 10 のいずれかに記載の医薬組成物；
  12. 免疫細胞の表面に発現する CD52 に 4C8 抗体以外の CD52 アゴニストを作用させることにより調節性 T 細胞の分化誘導および/または増殖を促進する方法；
  13. 調節性 T 細胞が抗原選択性的抑制活性を有するものである、上記 12 記載の調節性 T 細胞の分化誘導および/または増殖を促進する方法；
  14. CD52 アゴニストが抗 CD52 抗体またはそのフラグメントである、上記 12 記載の方法；
  15. 抗 CD52 抗体がヒト化抗体またはヒト抗体である、上記 14 記載の方法；
  16. 上記ヒト化抗体がラットヒト化抗体 Campath-1H である、上記 15 記載の方法；
  17. 上記免疫細胞の表面に発現する CD3 に CD3 アゴニストを作用させることをさらに含む、上記 12 に記載の方法；
  18. CD3 アゴニストが抗 CD3 抗体またはそのフラグメントである、上記 17 記

載の方法；

- 1 9. 抗 CD3 抗体がヒト化抗体またはヒト抗体である、上記 1 8 記載の方法；
- 2 0. 上記免疫細胞が、末梢血、リンパ節または胸腺に含まれるものである、上記 1 2 ～ 1 9 のいずれかに記載の方法；
- 2 1. 上記免疫細胞が T 細胞である、上記 2 0 記載の方法；
- 2 2. 上記免疫細胞が末梢血単核球である、上記 2 1 記載の方法；
- 2 3. 免疫細胞への CD3 アゴニスト刺激および CD52 アゴニスト刺激が、生体外で行われるものである上記 1 2 ～ 2 2 のいずれかに記載の方法；
- 2 4. 免疫細胞への CD3 アゴニスト刺激および CD52 アゴニスト刺激が、生体内で行われるものである上記 1 2 ～ 2 2 のいずれかに記載の方法；
- 2 5. 免疫抑制効果、調節性 T 細胞の分化誘導および/もしくは増殖促進ならびに/または免疫細胞の経血管内皮細胞遊走抑制効果を有する薬剤となる、抗 CD52 ヒト化抗体またはヒト抗体を作製する方法；
- 2 6. 免疫抑制効果、調節性 T 細胞の分化誘導および/もしくは増殖促進ならびに/または免疫細胞の経血管内皮細胞遊走抑制効果を有する薬剤を、CD52 との相互作用を指標にスクリーニングする方法。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願第 2003-95765 号ならびに日本国特許出願第 2003-413786 号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、4C8 陽性クローンの 1 つを導入した COS-1 細胞の FACS 解析結果である。太実線は 4C8mAb、破線はアイソタイプコントロールで染色した結果である。他の陽性クローンからも同様の結果を得た。

図 2 は、4C8mAb または Campath-1H を CD3 と共に副刺激した細胞を添加して CD4 陽性 T 細胞の抗 CD3 抗体刺激による増殖をチミジンの取り込みにより測定したところ、4C8mAb 副刺激細胞および Campath-1H 副刺激細胞ともに添加した細胞数に依存的に、CD4 陽性 T 細胞の抗 CD3 抗体刺激による増殖を抑制することを示す図である。

図 3 は、4C8mAb または Campath-1H 添加による CD3 陽性 T 細胞のヒト臍帯静脈血管単層内皮細胞下のコラーゲンゲル内への遊走抑制を調べた結果である。4C8mAb および Campath-1H とともに、CD3 陽性 T 細胞の経内皮細胞遊走性を抑制した。

図 4 は、4C8mAb 副刺激細胞の混合リンパ球培養反応の抑制を調べた結果である。4C8mAb 副刺激細胞は CD4 陽性 T 細胞混合リンパ球培養反応を添加細胞数依存的に抑制した。

図 5 は、Campath-1H を用いて誘導した調節性 T 細胞による、アロ抗原刺激 CD4 陽性 T 細胞の反応の抑制を調べた結果である。Campath-1H 副刺激細胞は CD4 陽性 T 細胞混合リンパ球培養反応を添加細胞数依存的に抑制した。

図 6 は、抗 CD52 抗体副刺激により誘導される調節性 T 細胞の CD8 陽性 T 細胞混合リンパ球培養反応に対する抑制を調べた結果である。4C8mAb 副刺激細胞は CD8 陽性 T 細胞混合リンパ球培養反応を添加細胞数依存的に抑制した。

図 7 は、Campath-1H 副刺激により誘導される調節性 T 細胞の、CD8 陽性 T 細胞混合リンパ球培養反応に対する抑制を調べた結果である。Campath-1H 副刺激により誘導される調節性 T 細胞は CD8 陽性 T 細胞混合リンパ球培養反応を添加細胞数依存的に抑制した。

図 8 は、アロ抗原反応後の CD4 陽性 T 細胞からの調節性 T 細胞の誘導を調べた結果である。アロ抗原反応に用いた单球由来成熟樹状細胞の提供者である提供者 B に対する反応において、アロ抗原反応後調節性 T 細胞はコントロール調節性 T 細胞よりも強い抑制活性を示したが、第三者である提供者 C に対する反応において、両者の抑制活性は同等であった。

図 9 は、抗 CD52 抗体副刺激により誘導される調節性 T 細胞の *in vitro* 増幅時の細胞数の変化である。培養 3 日目から 8 日目まで IL-2 存在下で培養することにより調節性 T 細胞の増幅が認められた。

図 10 は、培養 8 日目 (day 8) における調節性 T 細胞の抑制アッセイの結果である。増幅された調節性 T 細胞ではその抑制能の減少が認められた。

図 11 は、再度抗 CD52 抗体副刺激を施した後 (day 15) の調節性 T 細胞の抑制アッセイの結果である。増幅された調節性 T 細胞の抑制能は、コントロール細胞に比較して同等であった。

図12は、Campath-1H副刺激により誘導される調節性T細胞のin vitroにおける増幅を調べた結果である。IL-2存在下での培養によってCampath-1H副刺激細胞は4C8mAb副刺激細胞同様、10倍以上に増幅した。

図13は、Campath-1H副刺激細胞の増幅後の抑制活性を調べた結果である。Campath-1H副刺激細胞は4C8mAb副刺激細胞同様に増幅後も抑制活性を保持していた。

図14は、TM- $\beta$ 1抗体投与翌日に、亜致死量の放射線を照射したSCIDマウスに、ヒトPBMCの1もしくは $2\times 10^7$ 個を単独で投与、4C8mAb副刺激により誘導した調節性T細胞の $1\times 10^7$ もしくは $2\times 10^7$ 個を単独で投与、またはPBMCと4C8mAb副刺激により誘導した調節性T細胞の各 $1\times 10^7$ 個（合計 $2\times 10^7$ 個）を混じて腹腔内投与したマウスの体重の推移を示す。

図15は、TM- $\beta$ 1抗体投与翌日に、亜致死量の放射線を照射したSCIDマウスに、ヒトPBMCの $1\times 10^7$ もしくは $2\times 10^7$ 個を単独で投与、4C8mAb副刺激により誘導した調節性T細胞の $1\times 10^7$ もしくは $2\times 10^7$ 個を単独で投与、あるいはPBMCと4C8mAb副刺激により誘導した調節性T細胞の各 $1\times 10^7$ 個（合計 $2\times 10^7$ 個）を混じて腹腔内投与したマウスの生存率を示す。

図16は、TM- $\beta$ 1抗体投与翌日に、亜致死量の放射線を照射したSCIDマウスに、ヒトPBMCの $1.2\times 10^7$ 個を単独、Campath-1H副刺激により誘導した調節性T細胞の $1.2\times 10^7$ 個を単独、あるいはPBMCとCampath-1H副刺激により誘導した調節性T細胞の各 $1.2\times 10^7$ 個（合計 $2.4\times 10^7$ 個）を混じて腹腔内投与したマウスの体重の推移を調べた結果である。PBMC単独投与群では約1週間後に一過性の体重回復傾向を示したが、その後また継続的に体重が減少した。一方、PBMCと調節性T細胞混合投与群では細胞非投与群と同様な体重変動を示した。なお、調節性T細胞単独投与群は12日目に剖検を行ったため12日目までしか体重を測定していない。

図17は、TM- $\beta$ 1抗体投与翌日に、亜致死量の放射線を照射したSCIDマウスに、ヒトPBMCの $1.2\times 10^7$ 個を単独、Campath-1H副刺激により誘導した調節性T細胞の $1.2\times 10^7$ 個を単独、あるいはPBMCとCampath-1H副刺激により誘導した調節性T細胞の各 $1.2\times 10^7$ 個（合計 $2.4\times 10^7$ 個）を混じて腹腔内投与したマウスの生

存率を示す。PBMC 単独投与群は、21 日目に全例が死亡し、細胞非投与群ならびに PBMC と調節性 T 細胞混合投与群は全例が観察期間中生存した。

図 18 は、PBMC 単独投与群のマウスと PBMC と調節性 T 細胞混合投与群のマウスの消化管(盲腸)の組織所見を示す。試験期間の中間で実施した消化管の組織所見の観察において、PBMC 単独投与群(左図)では、特に盲腸で粘膜下層における単核細胞浸潤と水腫、毛細血管の拡張などが種々の程度で認められたが、PBMC と調節性 T 細胞混合投与群(右図)や調節性 T 細胞単独投与群ならびに細胞非投与群ではそれらの変化が認められなかった。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本明細書において、CD52 アゴニストとは、免疫細胞表面に発現する CD52 抗原に作用することにより、CD52 を介した細胞内ヘシグナルを伝達し得る物質を意味する。CD52 アゴニスト刺激により誘導されたシグナルにより、1)当該細胞の調節性 T 細胞への分化および/もしくは 2)調節性 T 細胞としての特性を保持した状態での増殖、ならびに/または 3)当該細胞の経血管内皮細胞遊走の抑制という応答が惹起され得る。CD52 アゴニストは、CD52 抗原に対する天然または合成のリガンド、すなわち CD52 分子を介してシグナルを誘導するあらゆる分子、および CD52 抗原に対する抗体を包含する。かかる抗体は、CD52 のいずれの部位を認識するものであっても、CD52 を介するシグナルを誘導するものであればよい。本発明において使用される抗体は、益山らの報告(Masuyama, J. et al., 1999. J. Exp. Med. 189:979-989; WO99/12972 号公報)に従い、ヒト T 細胞を免疫した動物より得られたモノクローナル抗体から、T 細胞の *in vitro* 血管外遊走を抑制することを指標に選抜することにより得られる、CD52 抗原アゴニスト機能を有する抗体などが挙げられる。また、抗体分子の抗原認識部位を保持する抗 CD52 抗体フラグメントもまた、本発明の CD52 アゴニストとして有用である。

また、本発明に有用な CD52 アゴニストとして、ラットヒト化抗体 Campath-1H (アレツズマブ; Alemtuzumab) が挙げられる。これは、Campath (登録商標) として市販されており入手可能であり、また、その詳細な作製法については特許公

報特表平2-503514に記載されている。

抗原として使用されるT細胞にはヒトから採取された末梢血単核球画分を、コラーゲンゲル上で単層に培養されたヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）と共に培養した後、該単層を通過して遊走した単核球を用いることにより、効率的に所望の抗体を取得しうる。ハイブリドーマの選抜にあたっては、ハイブリドーマ JM-1（独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに2001年9月26日付けて受託番号 FERM BP-7757 で寄託）により產生される抗4C8抗体を競合試薬として用いることにより、被検抗体によるT細胞染色が抑制されること（すなわちハイブリドーマ JM-1 により產生される抗 CD52 抗体と同一エピトープを認識すること）を指標にした選抜を組み合わせることにより、取得はさらに容易となる。また、抗4C8抗体と同一エピトープを認識する抗体の選抜工程と、本発明の実施例に記載した調節性T細胞の分化・増殖誘導能を評価する工程を組み合わせることによつても、本発明に使用する抗体を容易に取得することができる。また、例えばハイブリドーマ JM-1 により產生される抗 CD52 抗体の可変領域をヒト抗体のフレームワークに移植することにより、本発明に使用する抗体としていわゆるヒト化抗体を取得することも可能である。また、再配列されていないヒト抗体遺伝子を保持し、抗原の感作により当該抗原に特異的なヒト抗体を產生するマウス（例えば Tomizuka et al., 2000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722）を使用することにより、本発明に使用する抗体としてヒト抗体を取得することも可能である。

本発明の方法において、CD52 を発現する免疫細胞に対して、CD52 に加えて、CD3 アゴニストを作用させることによって、CD52 の調節性 T 細胞への分化誘導能およびその増殖促進能が発揮され得る。これは、T 細胞の分化に関わる主たる刺激伝達経路である CD3 分子を介した信号伝達系を主刺激経路とすれば、CD52 を介した経路がいわゆる副刺激経路となる。本明細書において、CD3 分子を介した刺激に加えて CD52 を介した刺激をもたらすことを、CD52 副刺激と称することがある。本明細書において CD3 アゴニストとは、免疫細胞の表面に発現した CD3 分子に作用し、CD3 を介した細胞内への信号伝達により、当該細胞の分化が促進されるという反応を惹起しうる物質を意味する。CD3 アゴニストの例としてアゴニスティックな抗 CD3 抗体、例えば OKT3 (ATCC CRL-8001)、UCHT1 (B. D. PharMingen)、

HIT3a (B. D. PharMingen) が挙げられる。また、種々の T 細胞抗原受容体に対するアゴニスト、特にアゴニスト作用を有する抗体またはそのフラグメントも、T 細胞抗原受容体と CD3 の複合体形成をもたらし、CD3 を介した細胞内への信号伝達をもたらすので、本発明における CD3 アゴニストとして使用することができる。具体的には、ヒト T 細胞抗原受容体 V $\beta$ 6.7 に対する抗体である OT145 (Fossett et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83(20):7888-92) などが挙げられる。また、可溶性の HLA 分子あるいは HLA 分子と抗原ペプチドのテトラマー分子のような、T 細胞抗原受容体が認識してアゴニスト作用を及ぼす物質も使用し得る。

T 細胞やマクロファージなどの炎症細胞が血管内皮を通過して血管外の炎症部位へ遊走することは炎症反応の重要なステップである。このステップに関わることが知られているケモカインや接着因子などの分子の作用を低分子アンタゴニストや抗体などを用いて阻害することにより、アレルギーや各種免疫疾患を制御しようという試みは既に多く行われている (Yang, G. X. et al., (2003) Med. Res. Rev. 23: 369-392; Aydt, E. et al., (2002-2003) 70: 297-301; Erin, E. M. et al., (2002) Cuur. Drug Targets Inflamm. Allergy 1: 201-214; Saeki, T. et al., (2003) Curr. Pham. Des. 9: 1201-1208)。今回、新たに CD52 が T 細胞の経血管内皮細胞遊走に関わることが明らかとなったことにより、CD52 に対する抗体もしくはリガンド、または低分子アゴニストもしくはアンタゴニストを投与することで T 細胞の血管外への遊走を阻害し、ひいては炎症反応・免疫反応を抑制する可能性が示された。

抗 CD52 抗体である Campath-1H (アレツズマブ ; Alemtuzumab) については既に免疫を抑制する抗体として関節リウマチ、多発性硬化症、腎移植拒絶などを対象に臨床研究が実施されているが (Isaacs, J. D. et al. 2001. Arthritis Rheum. 44: 1998-2008; Coles, A. J. et al., (1999) Lancet 354: 1691-1695; Calne, R. et al., (1999) Transplantation 68: 1613-1616)、その作用機序は補体による細胞傷害または抗体依存的細胞性細胞傷害による CD52 発現リンパ球の除去である (Hale, G. 2001. Cytotherapy. 3:137-143)。リンパ球を除去すると、新たなリンパ球が再び分化してくるまでの間、リンパ球減少状態に陥る。関節リウマチを対

象とした Campath-1H の臨床試験において、Campath-1H によって引き起こされる低リンパ球状態は非常に長期にわたることが明らかとなっており、Campath-1H 投与後に減少した各種リンパ球が正常な細胞数に回復するまでに要する時間は、NK 細胞や単球で 1 ヶ月、B 細胞で 3-6 ヶ月であり、T 細胞においては 3 年後にも正常より低い細胞数であった (Isaacs, J. D. et al. 2001. *Arthritis Rheum.* 44: 1998-2008)。すなわち、Campath-1H による治療を停止したあとも、感染などのリスクが高い状態が継続するという副作用が生じる。これに対し、今回新たに得られた知見により、細胞除去作用を持たない抗 CD52 抗体にも免疫抑制作用が期待されることが明らかとなった。経血管内皮細胞遊走抑制を作用機序とする、リンパ球除去効果を持たないような抗 CD52 抗体を投与すれば、Campath-1H の場合と異なり長期にわたるリンパ球減少状態を引き起こすことなく免疫抑制効果を得ることが可能であると考えられる。

リンパ球除去効果を持たない抗 CD52 抗体の選別は、例えば次のような方法で可能である。まず、抗体による細胞除去の主要な作用機序である補体による細胞傷害および抗体依存的細胞性細胞傷害活性はいずれも抗体のサブクラスに大きく依存することが知られている。例えば、ヒト抗体では IgG4、マウス抗体では IgG1 が補体による細胞傷害および抗体依存的細胞性細胞傷害活性の低いサブクラスである (Maloney, D.G. (1998) "Unconjugated monoclonal antibody therapy of lymphoma." In: Grossbard ML, ed. *Monoclonal antibody-based therapy of cancer*. New York: Dekker: 53-79.)。そのような細胞除去活性を有さないサブクラスの抗体を選択、あるいはそのようなサブクラスの Fc 部分を遺伝子組換え技術により導入・置換した上で、*in vitro* で抗体の細胞傷害活性スクリーニングを実施する。補体による細胞傷害活性のスクリーニングは次のような方法で可能である。CD52 を発現しているターゲット細胞を <sup>51</sup>Cr と共に 37°C で 1 時間インキュベートし、ターゲット細胞を <sup>51</sup>Cr で標識する。この細胞を洗浄後、96well プレートに播種し、抗 CD52 抗体とヒト補体とを添加して 37°C で 2 時間インキュベートする。インキュベート後に上清を回収し、トップカウント (Packard) などを用いて上清中に放出された <sup>51</sup>Cr のカウントを測定することによってその抗体の補体による細胞傷害活性を評価可能である。また、抗体依存的細胞性細胞傷害活性は次の

のような方法でスクリーニングできる。CD52 を発現しているターゲット細胞を  $^{51}\text{Cr}$  と共に 37°Cで 1 時間インキュベートし、ターゲット細胞を  $^{51}\text{Cr}$  で標識する。この細胞を洗浄後、96well プレートに播種し、抗 CD52 抗体とヒト末梢血単核球とを添加して 37°Cで 4 時間インキュベートする。インキュベート後に上清を回収し、トップカウントなどを用いて上清中に放出された  $^{51}\text{Cr}$  のカウントを測定することによってその抗体の抗体依存的細胞性細胞傷害活性を評価可能である。上述の方法で選別された抗体がリンパ球除去活性を持たないことは、最終的にはヒトに投与した際のリンパ球数をモニターすることで確認できる。

上述のとおり、経血管内皮細胞遊走は、CD52 アゴニストを CD52 に作用させることにより抑制されるので、免疫応答が抑制され得る。また、CD3 と CD52 と共に刺激することによって調節性 T 細胞の分化誘導が促進され、かつ/または調節性 T 細胞の増殖が促進されることから、この CD3 と CD52 との同時刺激もまた、免疫応答の抑制をもたらす。したがって、本発明により提供される、CD52 アゴニストを有効成分として含有する医薬組成物、および CD52 アゴニストと CD3 アゴニストとを有効成分として含有する医薬組成物は、免疫抑制剤として有用であり得る。該医薬組成物は、さらに特定の免疫系の作用機序を標的とする薬剤として、調節性 T 細胞の分化誘導および/または増殖促進剤として有用であり得る。

また、本発明によって提供される、医薬組成物は、生体内に投与されるものであってもよいし、患者または別のヒトから採取した免疫細胞、特に T 細胞、あるいは免疫細胞を含む末梢血、リンパ液、リンパ節細胞、胸腺細胞を生体外で処理するためのものであっても良い。本発明の医薬組成物は、周知の方法で製剤化されうる。すなわち治療効果上許容される種々の添加物、例えば担体、pH 緩衝剤、安定化剤、賦形剤等を添加した医薬製剤が製造される。このような製剤は、好ましくは、生理学的に許容され得る希釈剤またはキャリアを含んでおり、適切なキャリアには、生理的食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水グルコース液、および緩衝生理食塩水が含まれるが、これらに限定されるものではない。或いは、CD52 アゴニストは凍結乾燥（フリーズドライ）し、必要なときに上記の緩衝水溶液を添加することにより再構成して使用してもよい。上記製剤の投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投

与、または、注射剤、点滴剤、坐薬等による非経口投与を挙げることができる。

上記医薬組成物の投与方法、投与量は、前臨床試験、臨床試験の過程において適宜決定されうる。例えば、症状、年齢、体重などによって異なるが、通常、経口投与では、成人に対して、1日約0.01mg～1000mgであり、これらを1回、または数回に分けて投与することができる。また、非経口投与では、1回約0.01mg～1000mgを皮下注射、筋肉注射または静脈注射によって投与することができる。

治療の対象となる疾患は、免疫抑制効果をもたらす処置が必要とされる疾患であり、具体的には移植片対宿主病（GVHD）あるいは移植片拒絶の治療または予防を目的とした臓器又は細胞移植前後における処置、リウマチなどの自己免疫疾患、あるいは接触過敏症などのアレルギー性疾患の治療または予防が挙げられる。

本発明において、患者または別のヒトから採取した免疫細胞、あるいは免疫細胞を含む末梢血、リンパ液、リンパ節細胞、胸腺細胞を生体外で処理することにより、調節性T細胞を増殖させ、患者の体内に戻す療法を採用することができる。末梢血または骨髄細胞を生体より採取し、患者の体内に戻す幹細胞移植療法はすでに実施されている。また、免疫細胞の1種である樹状細胞（dendritic cell）に人為的処理を施し、患者の体内に戻す癌治療も行われている（M. Jefford, et al., *The Lancet Oncology*, 2: 343-353, June, 2001）。採取された免疫細胞にCD52アゴニストおよびCD3アゴニストを作用させることにより、調節性T細胞の分化誘導および/または増殖を促進することができ、該調節性T細胞を増殖させた後に患者の体内に戻すことにより治療または予防効果を奏ずることができる。このようないわゆるエクスピボ（*ex vivo*）の方法は、基礎研究の場において開発された実験系をほぼそのまま治療の場において再現するものであるとも言える。薬剤の生体内への投与が、体内吸収、代謝、または未知の因子による干渉作用などの影響により、期待した治療効果を奏しえない場合がありうることと比較すると、より実用化へのリスクの低い方法であるといえる。

さらに、本発明は、調節性T細胞の分化誘導および/もしくは増殖促進ならびに/または免疫細胞の経血管内皮細胞遊走抑制効果を有する薬剤の開発のために、CD52を発現している細胞と候補化合物を接触させて、その相互作用またはCD52刺激応答を検出することにより、CD52との相互作用を指標にしてCD52アゴニス

トとなる化合物をスクリーニングすることも包含する。

#### 実施例 1：4C8 抗原の同定

ヒト T 細胞が血管内皮細胞に接着した後の内皮下への遊走に関与する分子を同定する目的で最初に発見された免疫系細胞の一部に発現する膜タンパク質である 4C8 抗原に対するモノクローナル抗体 4C8 抗体が、T 細胞の *in vitro* 血管外遊走を抑制することを、すでに本発明者らは明らかにしている (Masuyama, J. et al., 1999. *J. Exp. Med.* 189:979-989; WO99/12972 号公報)。

まず、この 4C8 抗原の正体の同定を試みた。4C8 抗原は、4C8mAb 陽性細胞画分である CD3 陽性細胞を遺伝子源として cDNA ライブラリーを作製し、ライブラリーを一過性に発現させた COS-1 細胞を 4C8mAb と MACS (Miltenyi Biotec) を用いて濃縮することにより、単離・同定した。

ヘパリン添加ヒト末梢血から Ficoll-Hypaque による密度勾配遠心法により末梢血単核球を分離し、CD3 陽性 T 細胞を抗 CD3 抗体 (Miltenyi Biotec) と MACS を用いて調製した。10<sup>6</sup> 個の CD3 陽性 T 細胞から RNeasy Mini Kit (QIAGEN Inc.) を用い、90 μg の総 RNA を得た。poly(A)<sup>+</sup>RNA は Oligotex<sup>TM</sup>-dT30 <Super>mRNA Purification Kit (TAKARA BIO Inc.) を用いて精製し、90 μg の総 RNA から 1.7 μg の poly(A)<sup>+</sup>RNA を得た。この poly(A)<sup>+</sup>RNA から Superscript<sup>TM</sup>Choice System for cDNA Synthesis (Invitrogen Co.) を用いて合成した cDNA はアガロースゲル電気泳動によりサイズ分画を行い、1 Kb から 10Kb の cDNA を真核細胞発現ベクター pEF18S (Ohashi, H. et al., 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 158-162) にクローン化した。その結果、7×10<sup>6</sup> 個の独立クローンからなる CD3 陽性 T 細胞由来 cDNA ライブラリーを得た。

上記ライブラリーの LB (Luria-Bertani) 培養液 500ml から、Endofree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN Inc.) を用いて 270 μg のプラスミドを得た。このうち 100 μg を 2×10<sup>7</sup> の COS-1 細胞に TransIT-LT1 (TAKARA BIO Inc.) を用いて一過性に導入した。ライブラリーを一過性に発現させた COS-1 細胞から 4C8mAb 陽性細胞を当該抗体と MACS とを用いて精製した。4C8mAb 陽性 COS-1 細胞から Hirt 法 (Hirt B., 1967. *J. Mol. Biol.*, 26:365-369) によりプラスミドを回収し、大腸菌 (ElectroMAX DH10B, Invitrogen Co.) に導入して増幅した後プラスミドを上記と同様に調製し

た。上記 COS-1 細胞導入からプラスミド回収までの工程を更に 3 回繰り返した。

こうして得られた濃縮ライブラリーより無作為に 384 個の独立プラスミドクローンを単離し、上記と同様に COS-1 細胞に一過性に導入した後、FACSCalibur (Becton-Dickinson) を用いて 4C8 陽性クローンを判別した。その結果、3 個のクローンが 4C8 陽性となることが判明した（図 1）。

陽性クローンの塩基配列を ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems) を用いて決定し、BLAST によりヌクレオチドデータベースの検索を行ったところ、3 つの陽性クローンはいずれも CD52 (Xia, M. Q. et al., 1991. Eur. J. Immunol. 21: 1677-1684) をコードすることが判明した。当該 cDNA を COS-1 細胞で発現させたものは、抗 CD52 抗体であることが知られている Campath-1H によっても染色された。また、CD52 と同じ GPI アンカータンパク質である CD48、CD58、CD59 の cDNA を COS-1 細胞で発現させ、4C8mAb による染色性を FACSCalibur で解析したところ陰性となり、4C8mAb が GPI アンカータンパク質に共通の構造を認識していないことが確認された（図示せず）。これらのことから、4C8 は CD52 であると断定された。

#### 実施例 2 : Campath-1H 副刺激による調節性 T 細胞の誘導

CD52 を抗原とするモノクローナル抗体 Campath-1H (C1H) を副刺激として用いたときに、4C8mAb を用いたときと同様に CD4 陽性 T 細胞から調節性 T 細胞が誘導されるかどうかを検討した。

健常人ボランティア末梢血から Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia) による密度勾配遠心法により末梢血単核球を分離した。CD4 陽性 T 細胞は、末梢血単核球より MACS CD4+ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) を用いて試薬製造者の操作手順書に従ってネガティブセレクションによって調製した。

プレートへの抗体の固相化は次のように行った。PBS を用いて 100ng/ml に調製した抗 CD3 抗体 (ORTHOCLONE OKT3, Ortho Biotech) を 48well プレート (Costar) に分注して 4°C で 24 時間インキュベーションを行って固相化した後、PBS を用いて 10 μg/ml に調製した 4C8mAb あるいは Campath-1H (CAMPATH, Berlex) を同様に固相化した。

前述の方法により調製した CD4 陽性 T 細胞は RPMI1640 (GIBCO) に 10%FCS と 15mM

の HEPES バッファーを添加した培地に懸濁し、上記の方法で抗体を固相化したプレートに  $8 \times 10^5$  cells/well となるように播種し、CO<sub>2</sub> インキュベータ中で 37°C / 5% CO<sub>2</sub> で 3 日間培養した。培養後に細胞を回収し洗浄した後、培地に再懸濁して 24well プレート (Costar) に  $1 \times 10^6$  cells/well となるように播種し、更に 4 日間無刺激下で培養して休止状態にしたものと 4C8mAb 副刺激細胞あるいは Campath-1H 副刺激細胞として抑制アッセイに供した。

抑制アッセイは次のように行った。96well U底プレート (ICN) に CD4 陽性 T 細胞  $1 \times 10^5$  cells/well を X 線照射 (5000rad) した末梢血単核球  $4 \times 10^5$  cells/well と共に播種し、抗 CD3 抗体を最終濃度 25ng/ml で添加して 3 日間培養した。このとき、調節性 T 細胞を加えなかった対照群と調節性 T 細胞として X 線照射 (5000rad) した 4C8mAb 副刺激細胞または Campath-1H 副刺激細胞を  $0.5 \sim 2 \times 10^5$  cells/well で添加した群とで [<sup>3</sup>H] チミジン取り込みを比較して抑制活性を評価した。[<sup>3</sup>H] チミジン取り込みは、培養 3 日目に  $0.2 \mu$  Ci/well の [<sup>3</sup>H] チミジンを添加して 8 時間後に細胞を回収し、細胞に取り込まれた [<sup>3</sup>H] チミジンのカウントをベータプレート (PerkinElmer) で測定することにより評価した。1 回のアッセイに用いた細胞は全て同一提供者由来である。

図 2 に示したように、Campath-1H 副刺激細胞は 4C8mAb 副刺激細胞と同様に CD4 陽性 T 細胞の抗 CD3 抗体刺激による増殖を添加細胞数依存的に抑制した。

### 実施例 3 : Campath-1H による CD3 陽性 T 細胞の経血管内皮細胞遊走の抑制

4C8mAb で報告されている CD3 陽性 T 細胞の経内皮細胞遊走に対する抑制活性 (Masuyama, J. et al., 1999, Journal of Experimental Medicine, 189(6), 979-989) が他の抗 CD52 抗体でも見られるかどうかを Campath-1H を用いて検討した。方法は上記論文で報告した方法に基づいて以下のように行った。

CD3 陽性 T 細胞は末梢血単核球からナイロンウールカラムを用いて CD3 陽性 T 細胞画分を濃縮した後、抗 CD16 磁気抗体 (Advanced Magnetics, Inc.) を用いたネガティブセレクションにより調製した。

50  $\mu$  l/well のコラーゲンゲルを敷いた 96well 平底プレート (Becton Dickinson) にヒト臍帯静脈血管内皮細胞をコンフルエントになるまで培養したものをアッセイに供した。CD3 陽性 T 細胞は M199 (GIBCO) に 0.5% BSA を添加した

培地中に 0.3~3 μg/ml の 4C8mAb または Campath-1H を加え、20 分間氷上に静置して前処置を行った。この CD3 陽性 T 細胞 ( $3 \times 10^5$ /well) を抗体処置後、洗浄せずに前述のヒト臍帯静脈血管内皮細胞を敷いたプレートに播種した。このプレートを 50×g で 1 分間遠心した後、37°C で 3 時間インキュベーションを行い、未接着 CD3 陽性 T 細胞と血管内皮細胞を EDTA で処理して洗浄除去後、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞層下のコラーゲンゲル内へ遊走している T 細胞数を位相差顕微鏡下で計数し、単位面積あたりの遊走細胞数を抗体処置群と未処置群で比較した。実験はすべてトリプリケートで行った。

図 3 に示したように、Campath-1H は 4C8mAb 同様に CD3 陽性 T 細胞の経内皮細胞遊走を抑制した。したがって、抗 CD52 抗体である Campath-1H は 4C8mAb とともに、経内皮細胞遊走抑制を誘導することが判明した。

#### 実施例 4-1: 抗 CD52 抗体副刺激により誘導される調節性 T 細胞の CD4 陽性 T 細胞混合リンパ球培養反応に対する抑制

抗 CD52 抗体副刺激により誘導される調節性 T 細胞がアロ抗原刺激による CD4 陽性 T 細胞の反応を抑制するかどうかを検討するため、CD4 陽性 T 細胞混合リンパ球培養反応アッセイを行った。抗 CD52 抗体としては 4C8mAb を使用した。

調節性 T 細胞は実施例 2 に示した方法で誘導した。刺激細胞として用いた単球由来成熟樹状細胞は次のように誘導した。末梢血単核球より MACS マイクロビーズ CD14 (Miltenyi Biotec) を用いて試薬製造者の操作手順書に従ってポジティブセレクションによって CD14 陽性細胞を調製した。CD14 陽性細胞を RPMI1640 に 10%FCS、2-メルカプトエタノール (GIBCO)、100ng/ml の IL-4、50ng/ml の GM-CSF を添加した培地に懸濁し、6well プレート (Falcon) に  $3 \times 10^6$ cells/well で播種して、5 日間培養後、最終濃度 10ng/ml の LPS を添加し、更に 24 時間培養を行つて単球由来成熟樹状細胞を誘導した。細胞の一部はフローサイトメータ (FACScan, Becton Dickinson) 解析に供し、成熟樹状細胞マーカーの発現を確認した。

混合リンパ球培養反応は提供者 A から調製した CD4 陽性 T 細胞 ( $1 \times 10^5$ cells/well) と異なる提供者 B から調製した単球由来成熟樹状細胞 ( $1 \times 10^4$ cells/well) を 96well U 底プレートに播種し、4 日間培養した。このとき、調節性 T 細胞を加えなかった対照群と調節性 T 細胞として X 線照射(5000rad)した

4C8mAb 副刺激細胞を  $1\sim2\times10^5$  cells/well で添加した群とで [ $^3$ H]チミジン取り込みを比較し抑制活性を評価した。 [ $^3$ H]チミジン取り込み測定は実施例 1 と同様に行った。但し、 [ $^3$ H]チミジン添加から細胞回収までの培養時間は 16 時間とした。

図 4 に示したように、 4C8mAb 副刺激細胞は CD4 陽性 T 細胞混合リンパ球培養反応を添加細胞数依存的に抑制した。

実施例 4-2 : Campath-1H 副刺激により誘導される調節性 T 細胞の CD4 陽性 T 細胞混合リンパ球培養反応に対する抑制

抗 CD52 抗体として Campath-1H を用いて誘導した調節性 T 細胞によってもアロ抗原刺激による CD4 陽性 T 細胞の反応が抑制されるかどうかを検討した。実験は上記実施例 4-1 と同様の方法で実施した。ただし、反応期間は 3 日間とした。

図 5 に示したように、 Camapth-1H 副刺激細胞は CD4 陽性 T 細胞混合リンパ球培養反応を添加細胞数依存的に抑制した。

したがって、 Campath-1H 副刺激により誘導される調節性 T 細胞は、 4C8mAb 副刺激により誘導される調節性 T 細胞と同様に、アロ抗原刺激による CD4 陽性 T 細胞の反応を抑制することが示された。

実施例 5-1 : 抗 CD52 抗体副刺激により誘導される調節性 T 細胞の CD8 陽性 T 細胞混合リンパ球培養反応に対する抑制

抗 CD52 抗体副刺激により誘導される調節性 T 細胞がアロ抗原刺激による CD8 陽性 T 細胞の反応に対しても抑制を示すかどうかを検討するため、 CD8 陽性 T 細胞混合リンパ球培養反応アッセイを行った。抗 CD52 抗体としては 4C8mAb を使用した。

CD8 陽性 T 細胞は、末梢血単核球より MACS CD8+ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) を用いて試薬製造者の操作手順書に従いネガティブセレクションによって調製した。調節性 T 細胞は実施例 2 に示した方法で誘導した。刺激細胞として用いた単球由来成熟樹状細胞は実施例 4-1 と同様に誘導した。

混合リンパ球培養反応は提供者 A から調製した CD8 陽性 T 細胞 ( $1\times10^5$  cells/well) と異なる提供者 B から調製した単球由来成熟樹状細胞 ( $1\times10^4$  cells/well) を 96well U 底プレートに播種し、 3 日間培養した。このとき、調節性 T 細胞を加えなかった対照群と調節性 T 細胞として X 線照射 (5000rad) した

4C8mAb 副刺激細胞を  $1-2 \times 10^5$  cells/well で添加した群とで [<sup>3</sup>H]チミジン取り込みを比較し抑制活性を評価した。 [<sup>3</sup>H]チミジン取り込み測定は上記実施例 4-2 と同様に行った。

図 6 に示したように、4C8mAb 副刺激細胞は CD8 陽性 T 細胞混合リンパ球培養反応を添加細胞数依存的に抑制した。

実施例 5-2 : Campath-1H 副刺激により誘導される調節性 T 細胞の CD8 陽性 T 細胞混合リンパ球培養反応に対する抑制

抗 CD52 抗体として Campath-1H を用いて誘導した調節性 T 細胞によってもアロ抗原刺激による CD8 陽性 T 細胞の反応に対しても抑制を示すかどうかを検討するため、CD8 陽性 T 細胞混合リンパ球培養反応アッセイを行った。実験は実施例 5-1 と同様の方法で実施した。

図 7 に示したように、Campath-1H 副刺激細胞は混合リンパ球培養反応を添加細胞数依存的に抑制した。

したがって、Campath-1H 副刺激により誘導される調節性 T 細胞は、4C8mAb 副刺激により誘導される調節性 T 細胞と同様に、アロ抗原刺激による CD8 陽性 T 細胞の反応を抑制することが示された。

実施例 6 : アロ抗原反応後の CD4 陽性 T 細胞からの調節性 T 細胞の誘導

アロ抗原反応後の CD4 陽性 T 細胞に抗 CD52 抗体副刺激を加えることによって、抗原選択性をもった調節性 T 細胞を誘導することができるかどうかを検討した。

刺激細胞として用いた単球由来成熟樹状細胞は次のように誘導した。実施例 4-1 に示した方法で調製した CD14 陽性細胞を、X-VIVO-15 培地 (Cambrex) に 1% 熱非効化済自己血漿、100 ng/ml IL-4、50 ng/ml GM-CSF を添加した培地に懸濁し、6well プレートに  $3 \times 10^6$  cells/well で 7 日間培養後、細胞を回収・洗浄し、前述の培地に 10 ng/ml IL-1 $\beta$  (R&D systems)、3  $\mu$ g/ml IL-6 (キリン社内施設にて生産)、10 ng/ml TNF $\alpha$  (PeproTech)、1  $\mu$ g/ml プロスタグラランジン E2 (Sigma) を添加した培地に懸濁して  $1 \times 10^6$  cells/well で 6well プレートに播種し、更に 2 日間培養して単球由来成熟樹状細胞を誘導した。CD4 陽性 CD45RA 陽性 T 細胞は上記実施例 2 に記載の方法で単離した CD4 陽性 T 細胞から、MACS CD45RA MicroBeads

(Miltenyi Biotec) を用いて、試薬製造者の操作手順書に従いポジティブセレクションによって調製した。

アロ抗原反応およびその後の調節性 T 細胞誘導は次のように行った。提供者 A から調製した CD4 陽性 CD45RA 陽性 T 細胞 ( $1 \times 10^6$  cells/well) と異なる提供者 B から調製した単球由来成熟樹状細胞 ( $1 \times 10^5$  cells/well) を、ピルビン酸 (Gibco) および MEM 非必須アミノ酸溶液 (Gibco) を添加した X-VIVO-15 培地に懸濁して 24well プレートに播種した。6 日間培養後、細胞を回収し、 $1 \times 10^6$  cells/well になるように再調製し、更に 4 日間培養した細胞をアロ抗原反応後 T 細胞として、この細胞集団から調節性 T 細胞の誘導を行った。調節性 T 細胞の誘導は実施例 2 に示した方法で行った。ただし、CD4 陽性 T 細胞の代わりにアロ反応後 T 細胞を用いた。対照群として、提供者 A から調製した CD4 陽性 T 細胞から調節性 T 細胞を誘導した。以下、アロ反応後 T 細胞から誘導した調節性 T 細胞をアロ抗原反応後調節性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞から誘導した調節性 T 細胞をコントロール調節性 T 細胞と記す。

各調節性 T 細胞の抑制活性の評価は実施例 4 に記載の混合リンパ球培養反応によって行った。ただし、刺激細胞として、アロ抗原反応後 T 細胞の作製の際に用いた提供者 B から調製した単球由来成熟樹状細胞、あるいは第三者である提供者 C から調製した単球由来成熟樹状細胞を用いた。反応の際の培地としては X-VIVO-15 培地にピルビン酸と非必須アミノ酸溶液を添加したもの用い、培養期間は 3 日間とした。

図 8 に示したように、提供者 B に対する反応において、アロ抗原反応後調節 T 細胞はコントロール調節性 T 細胞よりも強い抑制活性を示した。しかしながら、第三者である提供者 C に対する反応において、両者の抑制活性は同等であった。以上のことから、アロ抗原反応後 T 細胞から抗 CD52 抗体を用いて調節性 T 細胞を誘導することで、アロ抗原選択性の抑制活性を示す調節性 T 細胞が得られることが判った。

#### 実施例 7－1：抗 CD52 抗体副刺激により誘導される調節性 T 細胞の *in vitro* における増幅

抗 CD52 抗体副刺激により誘導される調節性 T 細胞を IL-2 存在下で培養するこ

とにより増幅が可能であるかどうかを検討した。

抗 CD3 抗体および 4C8 mAb を実施例 2 に記載の方法で固相化したプレートに、CD4 陽性 T 細胞を  $8 \times 10^5$  cells/well となるように播種して 3 日間培養した。培養後に細胞を回収・洗浄した後、100 U/ml IL-2 (Chiron) 含有培地に再懸濁して 24well プレートに  $1 \times 10^6$  cells/well となるように播種した。2 日間の培養の後、細胞を回収し、100 U/ml IL-2 含有培地で  $1 \times 10^6$  cells/well になるよう再調製して、更に 3 日間培養した。計 8 日間の培養後の細胞を回収し、一部を用いて 1 回目の抑制アッセイ (day 8) を実施例 2 に記載の方法で実施した。更に、8 日間培養後の細胞の一部は、洗浄したのち、抗 CD3 抗体および 4C8 mAb を固相化したプレートでの 3 日間の培養と無刺激下での 4 日間の培養を実施例 2 に示した方法で行い、得られた細胞を用いて 2 回目の抑制アッセイ (day 15) を実施した。対照群として、培養 3 日目から 8 日目までの期間を IL-2 不含培地で培養する点以外は全く同じ処理を行った細胞を、それぞれの抑制アッセイで用いた。

図 9 に示したように、IL-2 存在下で 5 日間培養することによって、細胞数は 10 倍以上に増加したが、図 10 に示したように、IL-2 存在下での培養直後に実施した 1 回目の抑制アッセイ (day 8) では、対照群に較べて抑制活性が大きく減弱していた。しかしながら、図 11 に示したように、この細胞に再度抗 CD52 抗体副刺激を施した後の 2 回目の抑制アッセイ (day 15) では、抑制活性の回復が見られた。15 日間の全培養期間で細胞数は 30 倍に増加した。

#### 実施例 7—2 : Campath-1H 副刺激により誘導される調節性 T 細胞の in vitro における増幅

抗 CD52 抗体として Campath-1H を用いて誘導した調節性 T 細胞も IL-2 存在下で培養することにより増幅が可能であるかどうかを検討した。

調節性 T 細胞の誘導および増幅は実施例 7—1 に記載の方法で実施した。ただし、副刺激として Campath-1H ( $30 \mu\text{g}/\text{ml}$  または  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  にてプレートに固相化) を用いた。また、IL-2 存在下での培養期間はこの実施例では 4 日間、抑制アッセイは day 14 でのみ実施した。IL-2 非添加群は設けず、実施例 7 同様に副刺激として 4C8mAb を用いたものを対照群とした。Campath-1H は 4C8mAb に較べて活性化能が若干弱い傾向があったため、充分な活性化を得るため、この実施例においては

固相化の際の条件として  $30 \mu\text{g}/\text{ml}$  あるいは  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  と高い濃度を設定した。

図 1 2 に示したように、IL-2 存在下での培養によって Campath-1H 副刺激細胞は 4C8mAb 副刺激細胞同様、10 倍以上に増幅した。また、図 1 3 に示したように Campath-1H 副刺激細胞は 4C8mAb 副刺激細胞同様に増幅後も抑制活性を保持していた。

したがって、IL-2 存在下での増幅後に抗 CD52 抗体副刺激を繰り返すことによって、抑制活性を保持した調節性 T 細胞を増幅することが可能であることが示された。

#### 実施例 8－1：SCID マウスへのヒト末梢血移入によるマウス致死作用の調節性 T 細胞同時移入による抑制と調節性 T 細胞の生体内における安全性

SCID マウス（6 週齢、オス、日本クレアから入手）に対し、NK 細胞の活性を抑制しヒト細胞を生着しやすくするために IL-2 受容体  $\beta$  鎖を認識する TM- $\beta$ 1 抗体（ $20 \mu\text{g}/\text{マウス}$ 、Pharmingen）をヒト細胞移入前日に腹腔内投与し、ヒト細胞移入日に亜致死量（ $2.5\text{Gy}$ ）の放射線を照射した後、ヒト細胞の移入を行った。健常人からアフェレーシスによって採取した末梢血を Lymphoprep（AXIS-SHIELD）による比重遠心法によって得た単核細胞（PBMC）、または同一ドナーの PBMC から実施例 2 に記載の方法で分離した CD4 陽性 T 細胞から 4C8mAb で増幅・誘導した（実施例 7 で示した方法による）調節性 T 細胞を用意し、PBMC  $1\times 10^7$  もしくは  $2\times 10^7$  個を単独で投与、調節性 T 細胞  $1\times 10^7$  もしくは  $2\times 10^7$  個を単独で投与、または PBMC と調節性 T 細胞各  $1\times 10^7$  個（合計  $2\times 10^7$  個）を混じて腹腔内投与する各群を設けた。その他に、細胞非移入群を設けた。なお、移入した PBMC を抗 CD3 抗体（Pharmingen）で染色し FACSCalibur flow cytometer（Becton Dickinson）にて測定することにより、PBMC に含まれる CD3 陽性 T 細胞の割合は、42%であることを確認している。何れの群も 5 匹のマウスを用いた。マウスの体重測定と状態の観察を細胞移入後 30 日間行った。

TM- $\beta$ 1 抗体を投与した SCID マウスにヒト PBMC を腹腔内投与すると、マウス体内でヒト T 細胞が活性化して増殖する結果、マウスが異種移植片対宿主症様を呈し衰弱死亡することを事前に確認している。今回の実験においても PBMC を単独で  $1\times 10^7$  もしくは  $2\times 10^7$  個移入されたマウスは、実験開始時に行なった放射線照射によ

る一過性の体重減少から回復することなく(図14)、何れの群においても全例が約2週間で死亡した(図15)。一方、調節性T細胞を単独で $1\times 10^7$ もしくは $2\times 10^7$ 個移入されたマウスでは、死亡例は認められず、細胞非移入群とほぼ同様な体重変動を示しながら(図14)、全例が30日間の観察期間終了まで生存した(図15)。PBMCと調節性T細胞を混じて投与された群では、PBMC単独移入群よりやや遅れて3/5例が死亡したが、残りの2/5例は観察期間終了時まで生存し、PBMC単独投与した何れの群よりも有意な生存延長(Logrank testによる)を示した(図15)。

#### 実施例8-2：SCIDマウスへのヒト末梢血投与によるマウス致死作用の調節性T細胞同時投与による抑制と調節性T細胞の生体内における安全性

SCIDマウス(8週齢、メス、日本クレアから入手)に対し、NK細胞の活性を抑制してヒト細胞を生着しやすくするために、IL-2 $\beta$ 受容体を認識するTM- $\beta$ 1抗体( $20\mu\text{g}/\text{マウス}$ , Pharmingen)をヒト細胞投与前日に腹腔内投与し、ヒト細胞投与日に亜致死量(2.5Gy)の放射線を照射した後、ヒト細胞の投与を行った。健常人からアフェレーシスによって採取した末梢血を、Lymphoprep(AXIS-SHIELD)による比重遠心法に供し、得られた単核細胞(PBMC)または同一ドナーのPBMCから実施例2記載の方法で単離したCD4陽性細胞からCampath-1Hで増幅・誘導した(実施例7-2参照)調節性T細胞を用意した。PBMC $1.2\times 10^7$ 個を単独で投与する群、調節性T細胞 $1.2\times 10^7$ 個を単独で投与する群、PBMCと調節性T細胞とをそれぞれ $1.2\times 10^7$ 個(合計 $2.4\times 10^7$ 個)を混じて腹腔内投与する群、および細胞を投与しない細胞非投与群を設けた。調節性T細胞単独投与群を除いた各群は、細胞投与後11日目で剖検を行い急性期の症状(組織所見を含む)を観察する群とマウスの体重測定と状態を21日間観察する群とに分け、それぞれの群には5匹のマウスを用いた。なお、得られた細胞数の関係から調節性T細胞単独投与群(2匹)は、細胞投与後12日目における剖検のみを行った。なお、投与したPBMC中に含まれるCD3陽性T細胞の割合は、抗CD3抗体(Pharmingen)で染色しFACSCalibur flow cytometer(Becton Dickinson)を測定することにより、49.4%であることが予め確認されている。

我々は、TM- $\beta$ 1抗体を投与したSCIDマウスにヒトPBMCを腹腔内投与すると、

マウス体内でヒト T 細胞が活性化して増殖する結果、マウスが異種移植片対宿主症様を呈し衰弱死亡することが事前に確認されている。今回の実験においても、PBMC を単独で投与されたマウスは、実験開始時に行った放射線照射による一過性の体重減少から回復することなく（図 1 6）、何れの群においても全例が 21 日目までに死亡した（図 1 7）。PBMC と調節性 T 細胞を混じて投与された群では、単純には合計 2 倍量のヒト細胞を投与されたにもかかわらず細胞非投与群とほぼ同様な体重の推移を示し（図 1 6）、全例が生存した（図 1 7）。なお、調節性 T 細胞を単独で投与されたマウスでは、細胞非投与群を上回る体重増加の回復傾向を示し（図 1 6）、マウスに対する急性期の侵襲を示すことは少ないことが示唆された。また、試験期間中の剖検時において、PBMC 単独投与群では消化管における単核細胞浸潤、水腫や毛細血管の拡張などがみられたが、PBMC と調節性 T 細胞混合投与群や調節性 T 細胞単独投与群ではそのような変化が認められなかった（図 1 8）。

以上の成績から、本 *in vivo* モデル系において調節性 T 細胞は PBMC と異なり、単独ではマウスに対して全く病原性を示さないこと、および単独投与で起こる PBMC のマウスに対する致死作用が調節性 T 細胞を同時に投与することにより顕著に抑制されることが明らかになった。またこれらのことから、抗 CD52 抗体により誘導された調節性 T 細胞は、生体内においても過度なヒト T 細胞の活性化を抑制することから、その投与は T 細胞の異常活性化に伴い発症する各種疾患に対し、有効な治療法となることが示唆された。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

### 産業上の利用の可能性

本発明により、CD52 を介したシグナルが免疫抑制的、すなわち、調節性 T 細胞の分化誘導および/または増殖促進ならびに経血管内皮細胞遊走抑制を誘導することが明らかとなり、CD52 に対する抗体を含む CD52 アゴニストが免疫抑制、調節性 T 細胞の分化誘導および/または増殖促進ならびに経血管内皮細胞遊走抑制のための医薬組成物、すなわち自己免疫疾患、アレルギー疾患および移植免疫応

答抑制等のための医薬組成物の有効成分として有用である。さらに、本発明により、CD52 アゴニストを用いて調節性 T 細胞を *ex vivo* で調製することが可能となり、自己免疫疾患および移植免疫応答の抑制などの免疫抑制が望まれる症状・疾患に対する治療および/または予防への利用が可能となる。

また、本発明によって示された、抗原選択性を持った調節性 T 細胞を用いることにより、従来の免疫抑制剤の使用で起こる可能性がある免疫系全般に対する抑制に伴う副作用を回避しつつ、標的抗原特異的な免疫反応のみを抑制することが期待できる。

## 請求の範囲

1. 4C8 抗体以外の CD52 アゴニストを有効成分として含有する、免疫抑制のための医薬組成物。
2. 4C8 抗体以外の CD52 アゴニストを有効成分として含有する、調節性 T 細胞の分化誘導および/または増殖促進のための医薬組成物。
3. 調節性 T 細胞が抗原選択的な抑制活性を有するものである、請求項 1 または 2 記載の医薬組成物。
4. CD3 アゴニストをさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の医薬組成物。
5. CD3 アゴニストが抗 CD3 抗体またはそのフラグメントである、請求項 4 記載の医薬組成物。
6. 抗 CD3 抗体がヒト化抗体またはヒト抗体である、請求項 5 記載の医薬組成物。
7. 4C8 抗体以外の CD52 アゴニストを有効成分として含有する、免疫細胞の経血管内皮細胞遊走抑制のための医薬組成物。
8. CD52 アゴニストが抗 CD52 抗体またはそのフラグメントである、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の医薬組成物。
9. 抗 CD52 抗体がヒト化抗体またはヒト抗体である、請求項 8 記載の医薬組成物。
10. 上記ヒト化抗体がラットヒト化抗体 Campath-1H である、請求項 9 記載の医薬組成物。
  11. 自己免疫疾患、アレルギー疾患または移植免疫応答の予防または治療のための、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項記載の医薬組成物。
  12. 免疫細胞の表面に発現する CD52 に 4C8 抗体以外の CD52 アゴニストを作用させることにより調節性 T 細胞の分化誘導および/または増殖を促進する方法。
  13. 調節性 T 細胞が抗原選択的な抑制活性を有するものである、請求項 1 2 記載の調節性 T 細胞の分化誘導および/または増殖を促進する方法。

1 4. CD52 アゴニストが抗 CD52 抗体またはそのフラグメントである、請求項 1 2 記載の方法。

1 5. 抗 CD52 抗体がヒト化抗体またはヒト抗体である、請求項 1 4 記載の方法。

1 6. 上記ヒト化抗体がラットヒト化抗体 Campath-1H である、請求項 1 5 記載の方法。

1 7. 上記免疫細胞の表面に発現する CD3 に CD3 アゴニストを作用させることをさらに含む、請求 1 2 記載の方法。

1 8. CD3 アゴニストが抗 CD3 抗体またはそのフラグメントである、請求項 1 7 記載の方法。

1 9. 抗 CD3 抗体がヒト化抗体またはヒト抗体である、請求項 1 8 記載の方法。

2 0. 上記免疫細胞が、末梢血、リンパ節または胸腺に含まれるものである、請求項 1 2 ~ 1 9 のいずれか 1 項記載の方法。

2 1. 上記免疫細胞が T 細胞である、請求項 2 0 記載の方法。

2 2. 上記免疫細胞が末梢血単核球である、請求項 2 1 記載の方法。

2 3. 免疫細胞への CD3 アゴニスト刺激および CD52 アゴニスト刺激が、生体外で行われるものである請求項 1 2 ~ 2 2 のいずれか 1 項記載の方法。

2 4. 免疫細胞への CD3 アゴニスト刺激および CD52 アゴニスト刺激が、生体内で行われるものである請求項 1 2 ~ 2 2 のいずれか 1 項記載の方法。

2 5. 免疫抑制効果、調節性 T 細胞の分化誘導および/もしくは増殖促進ならびに/または免疫細胞の経血管内皮細胞遊走抑制効果を有する薬剤となる、抗 CD52 ヒト化抗体またはヒト抗体を作製する方法。

2 6. 免疫抑制効果、調節性 T 細胞の分化誘導および/もしくは増殖促進ならびに/または免疫細胞の経血管内皮細胞遊走抑制効果を有する薬剤を、CD52 との相互作用を指標にスクリーニングする方法。

図 1

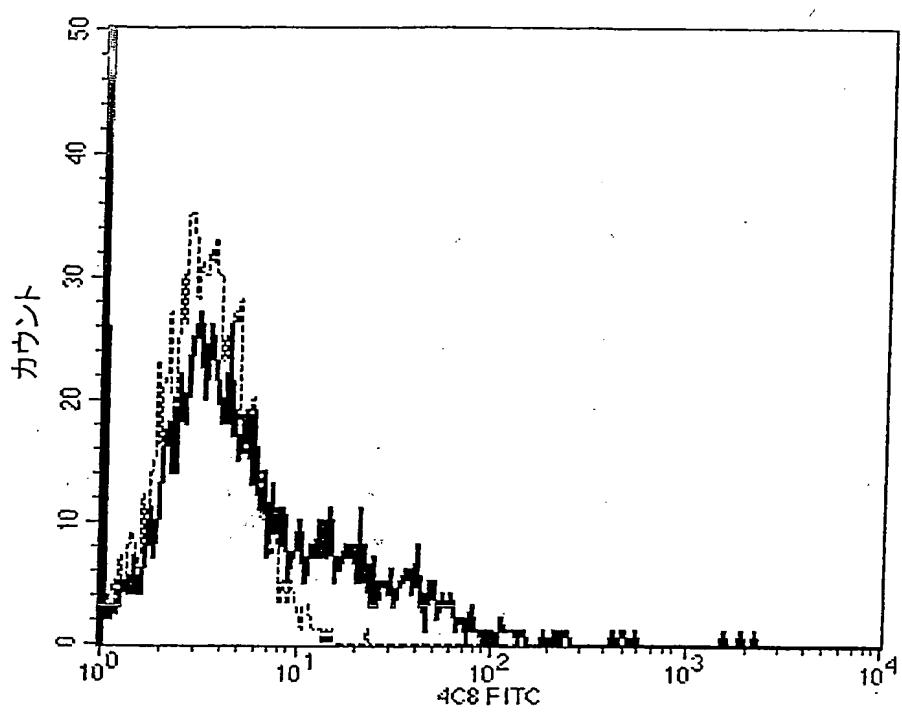


図 2

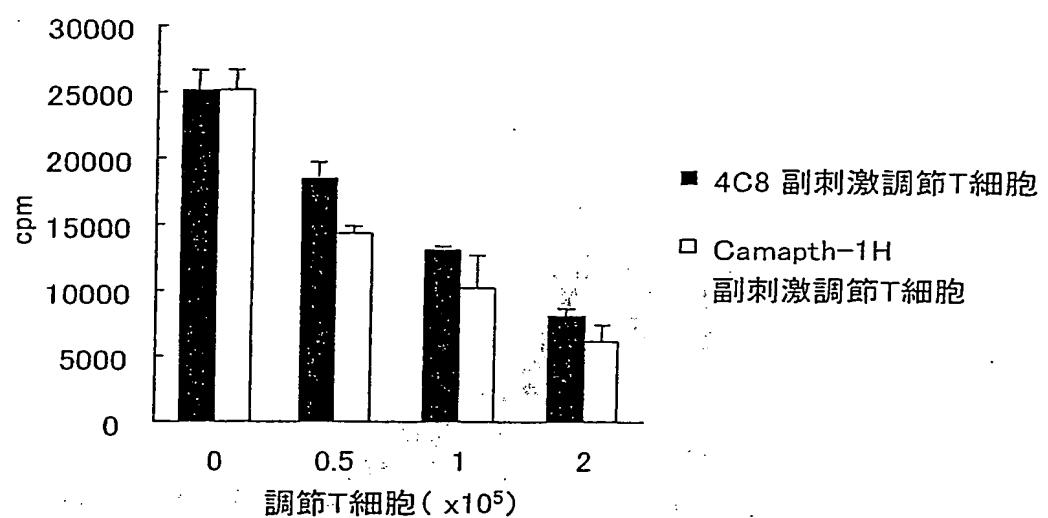


図 3

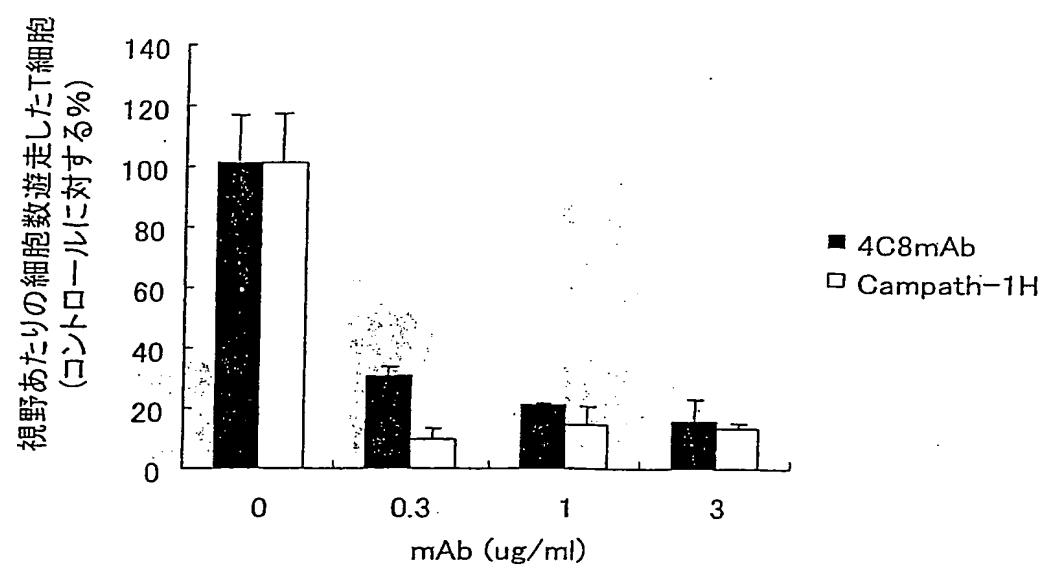


図 4

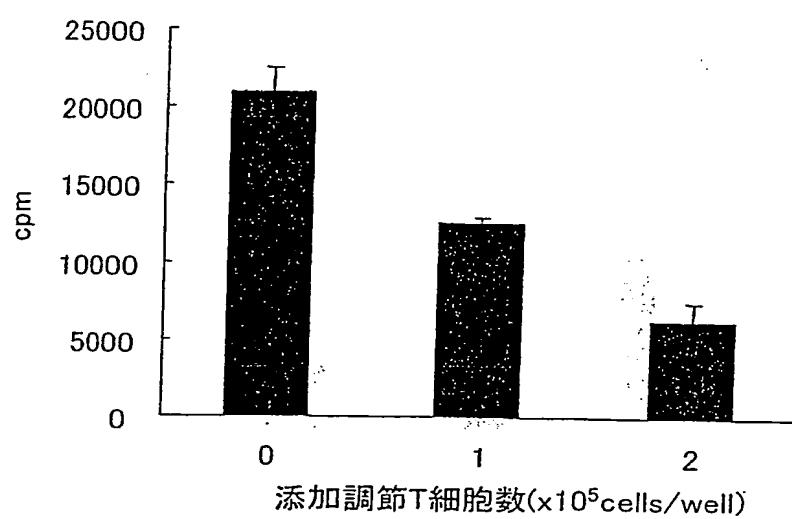


図 5

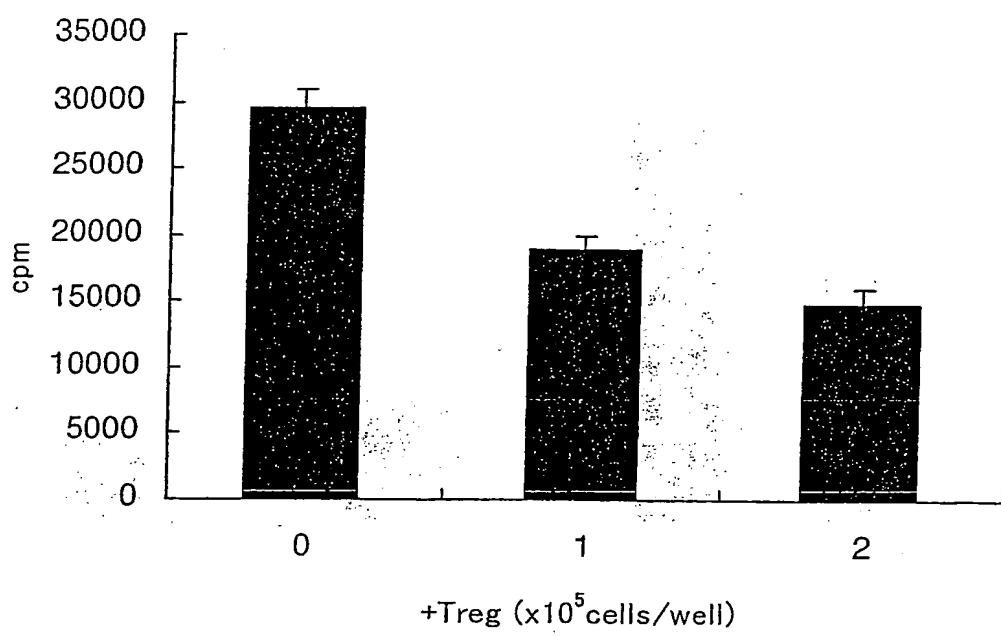


図 6

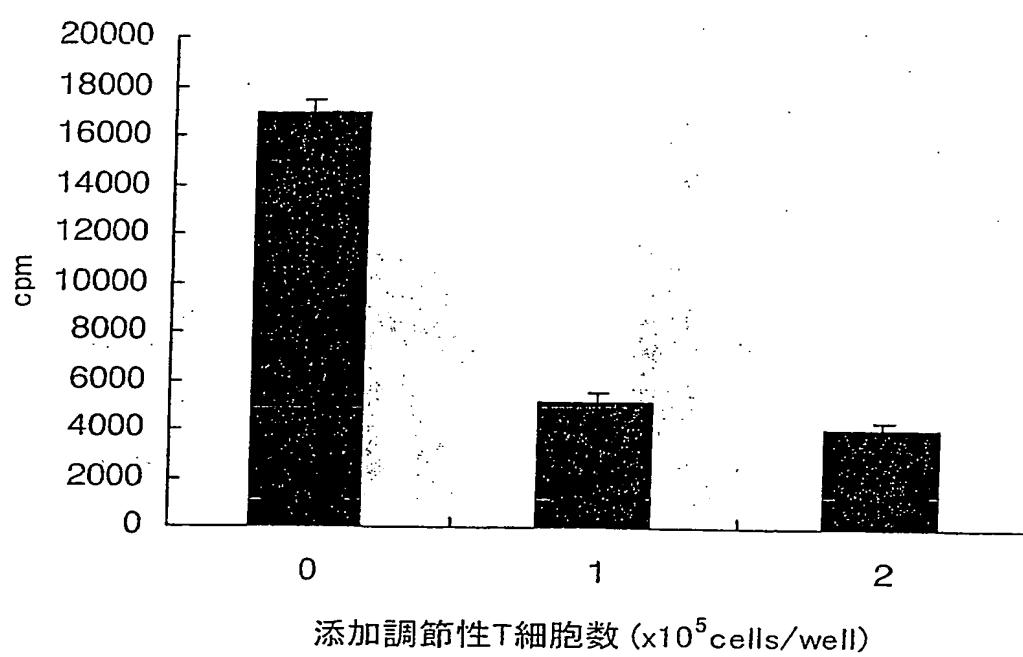
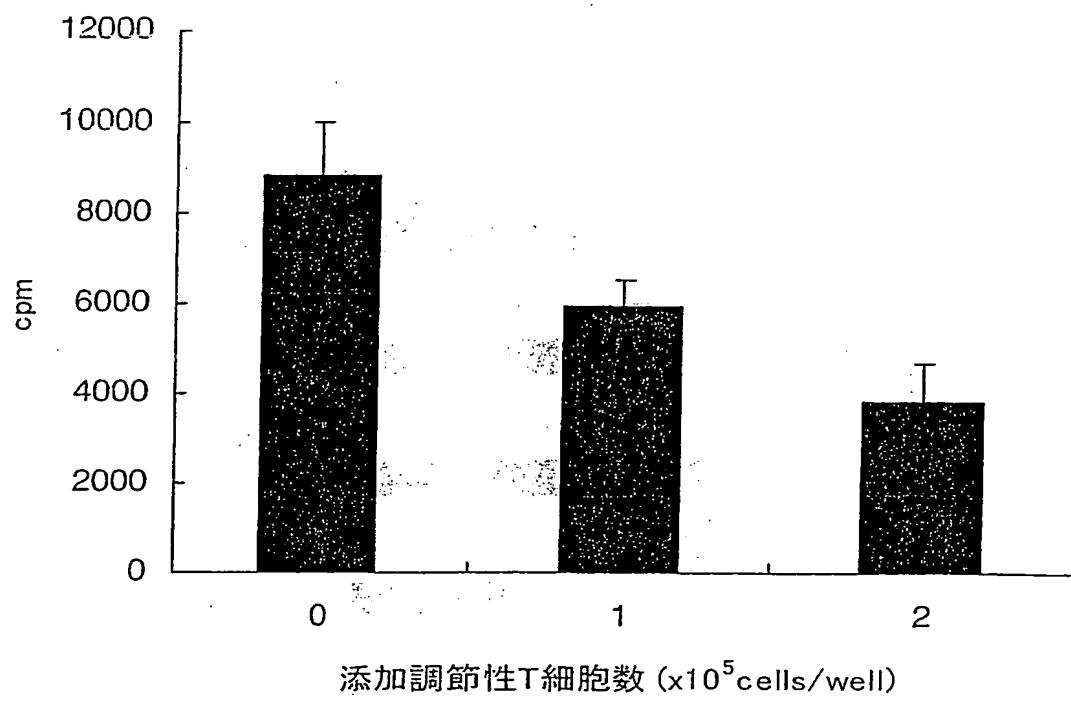


図 7



□ コントロール調節性T細胞  
□ アロ反応後調節性T細胞

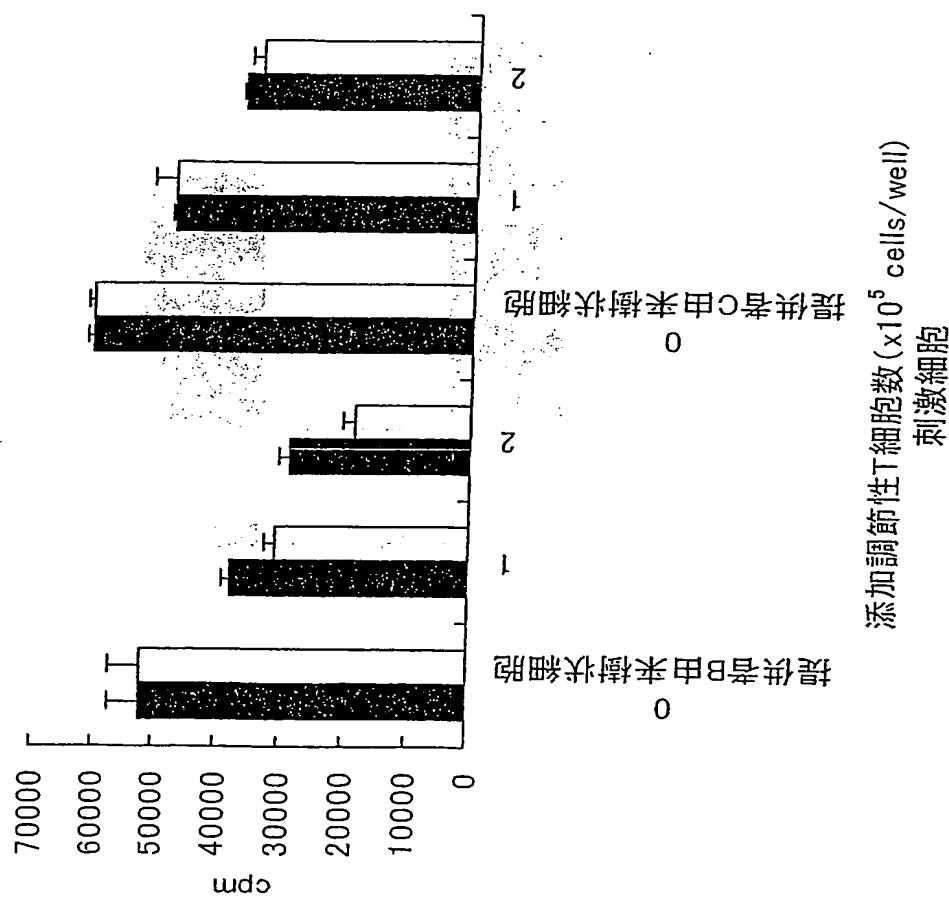


図8

図 9

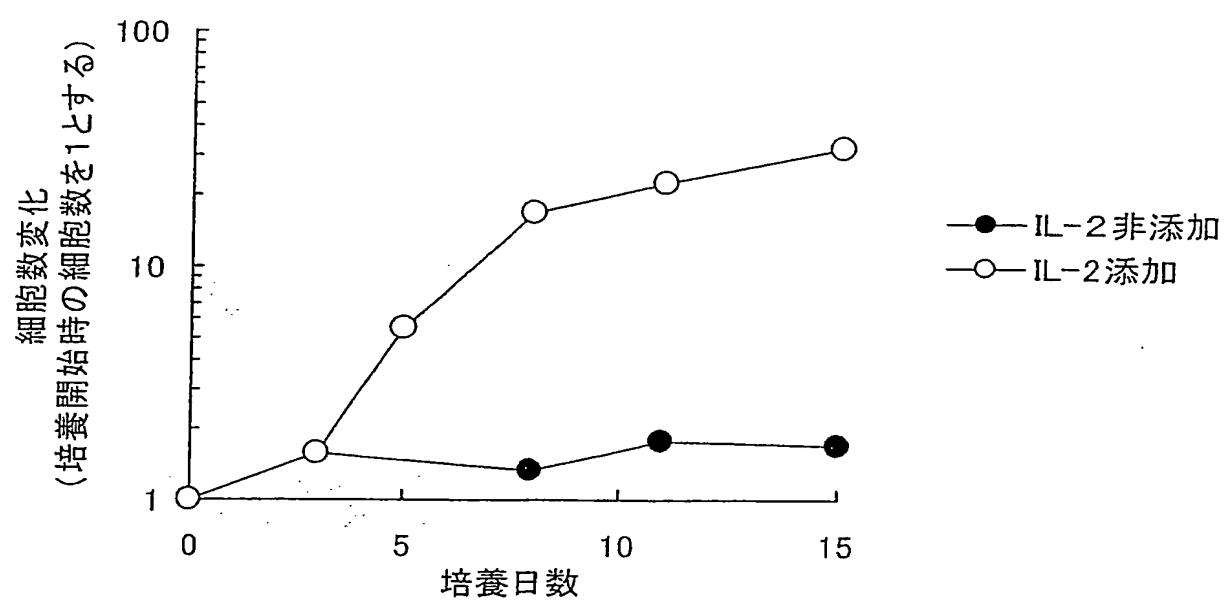
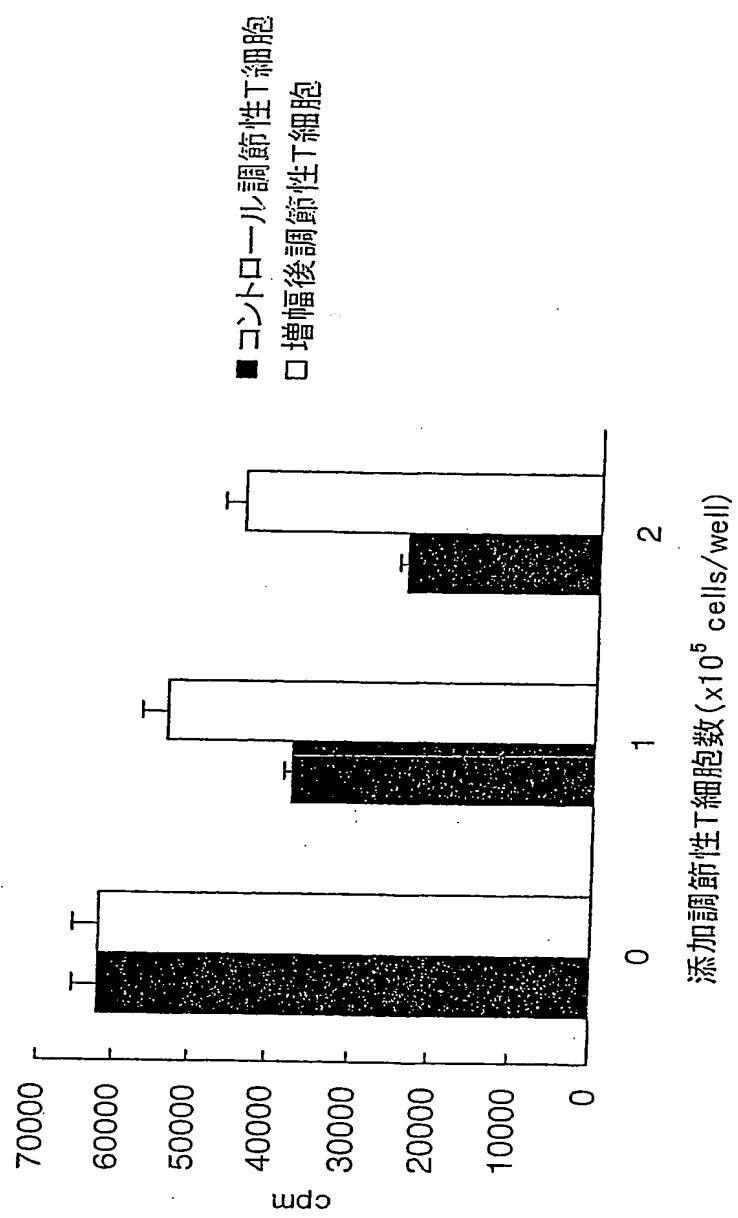


図10



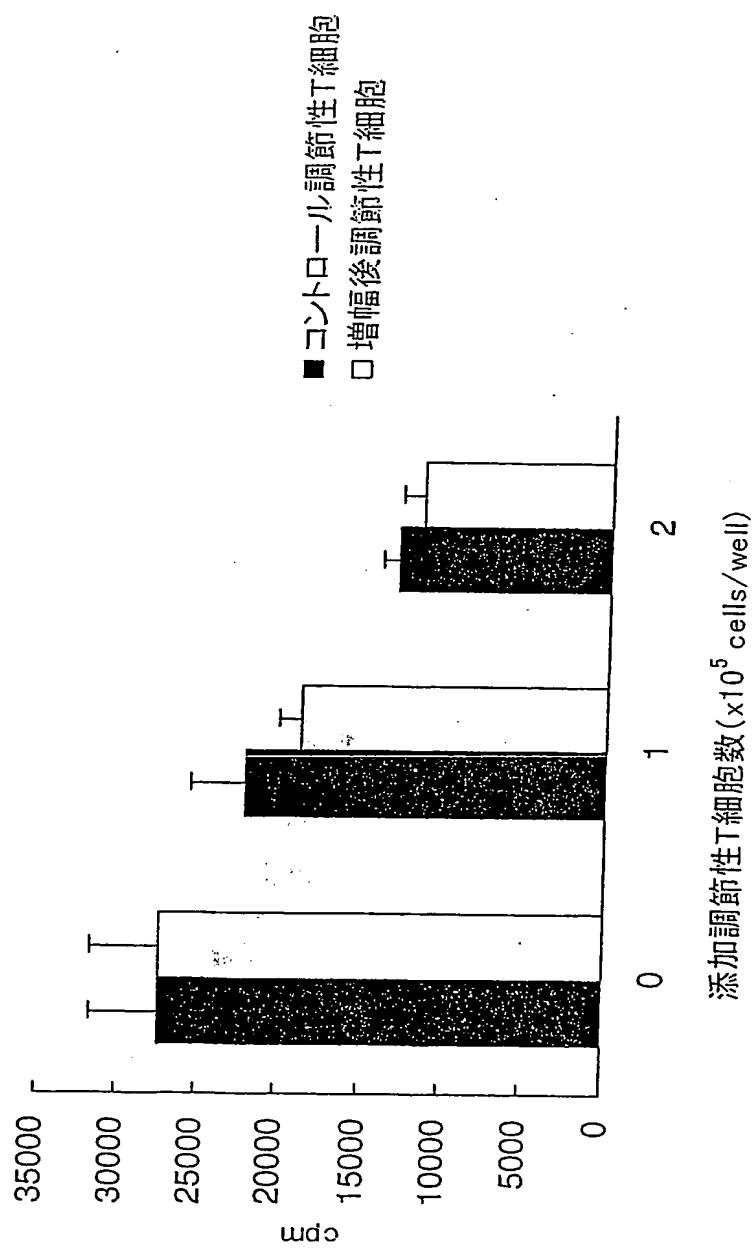
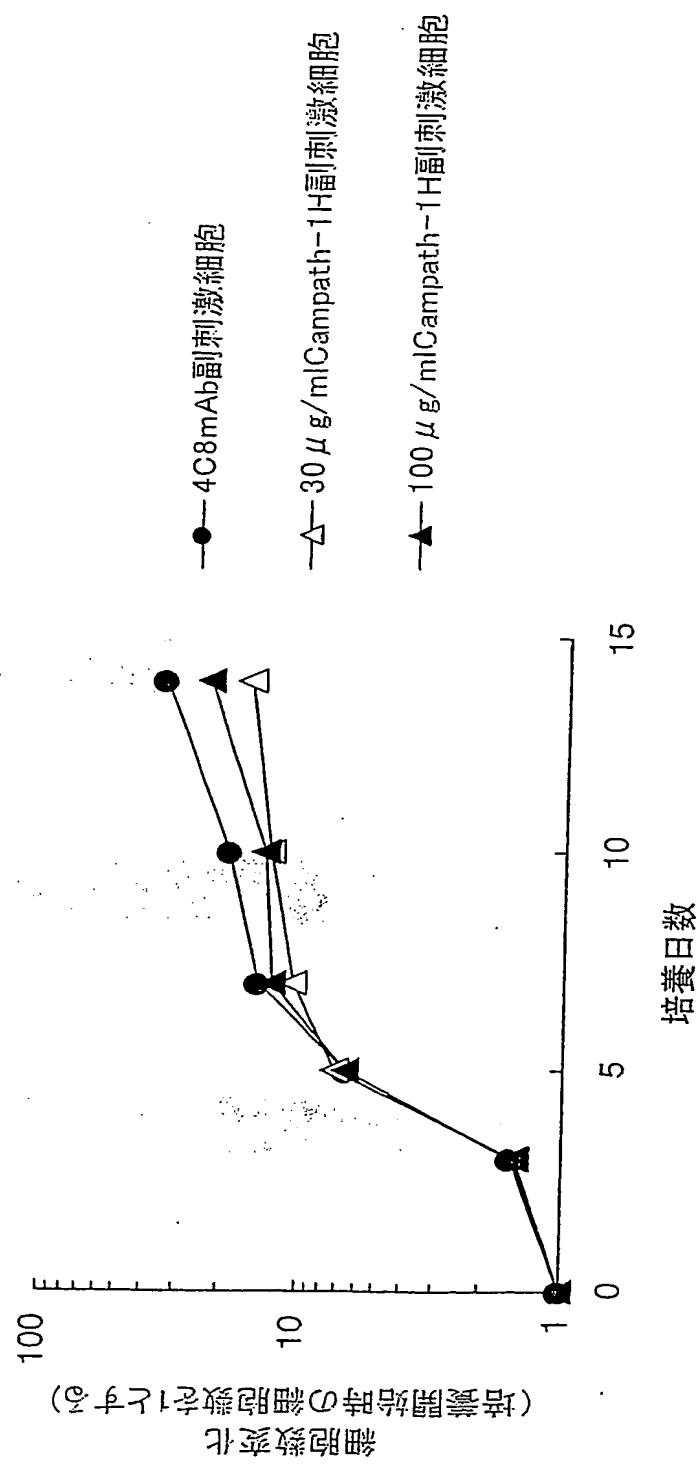


図 11

図12



1  
3  
■

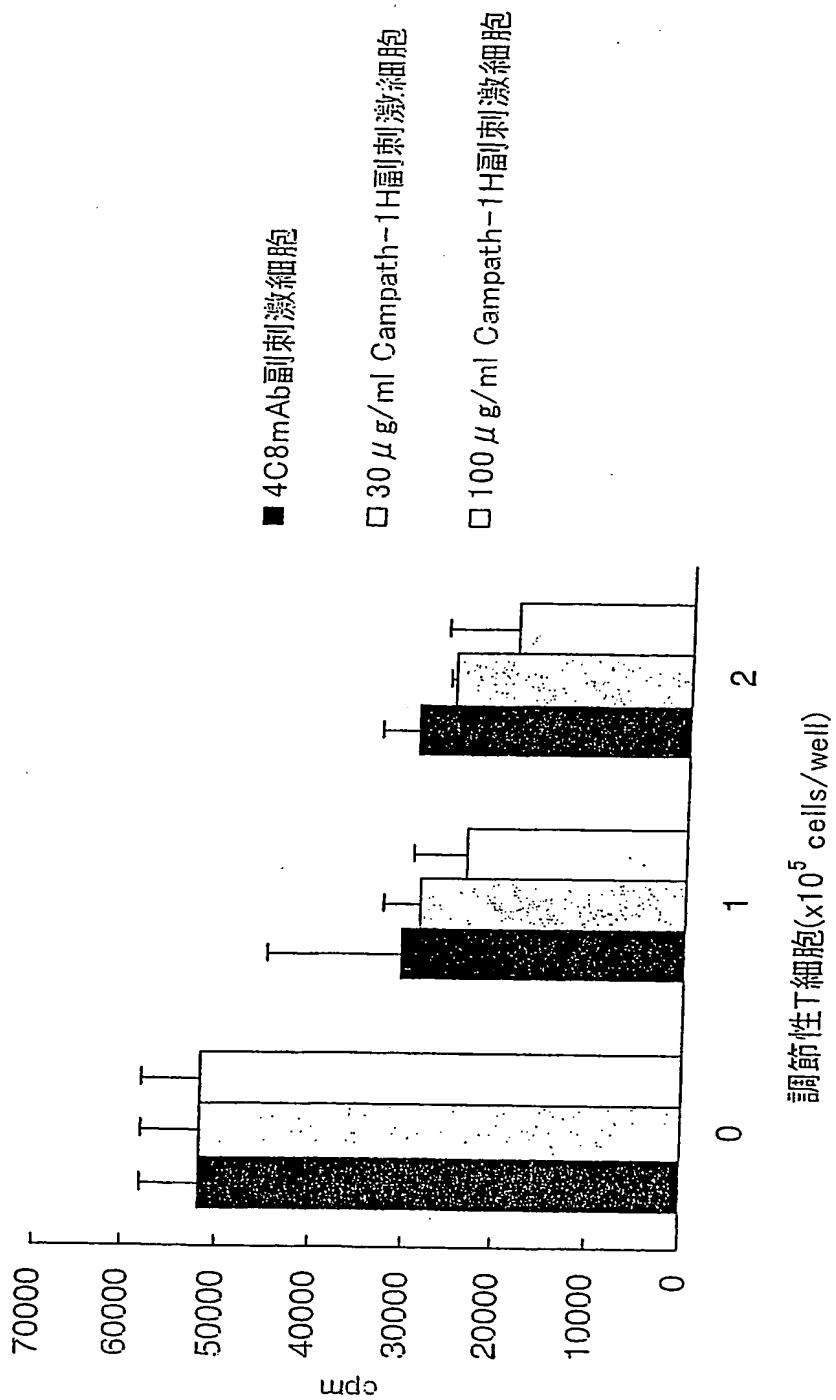


図 1 4

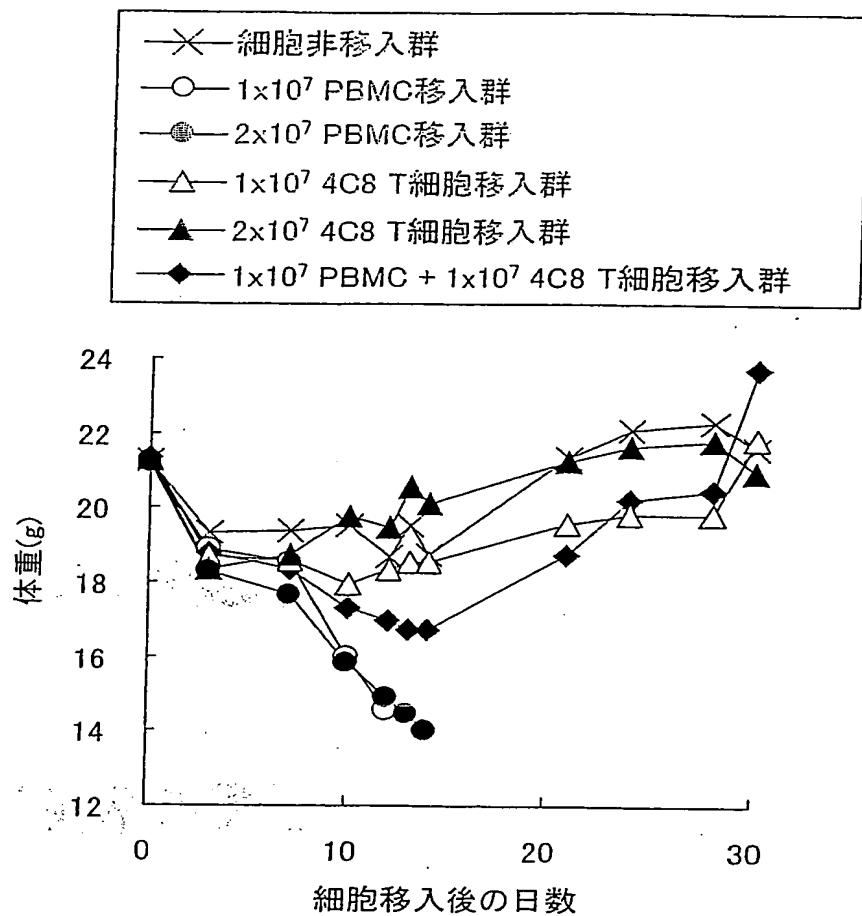


図 15

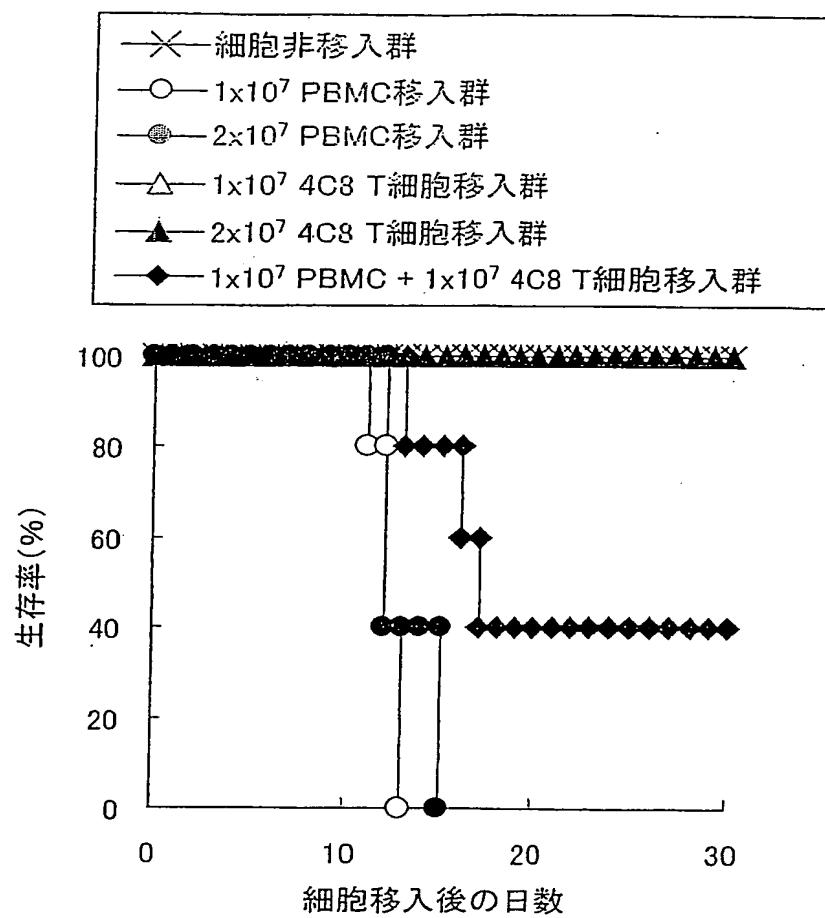


図 16

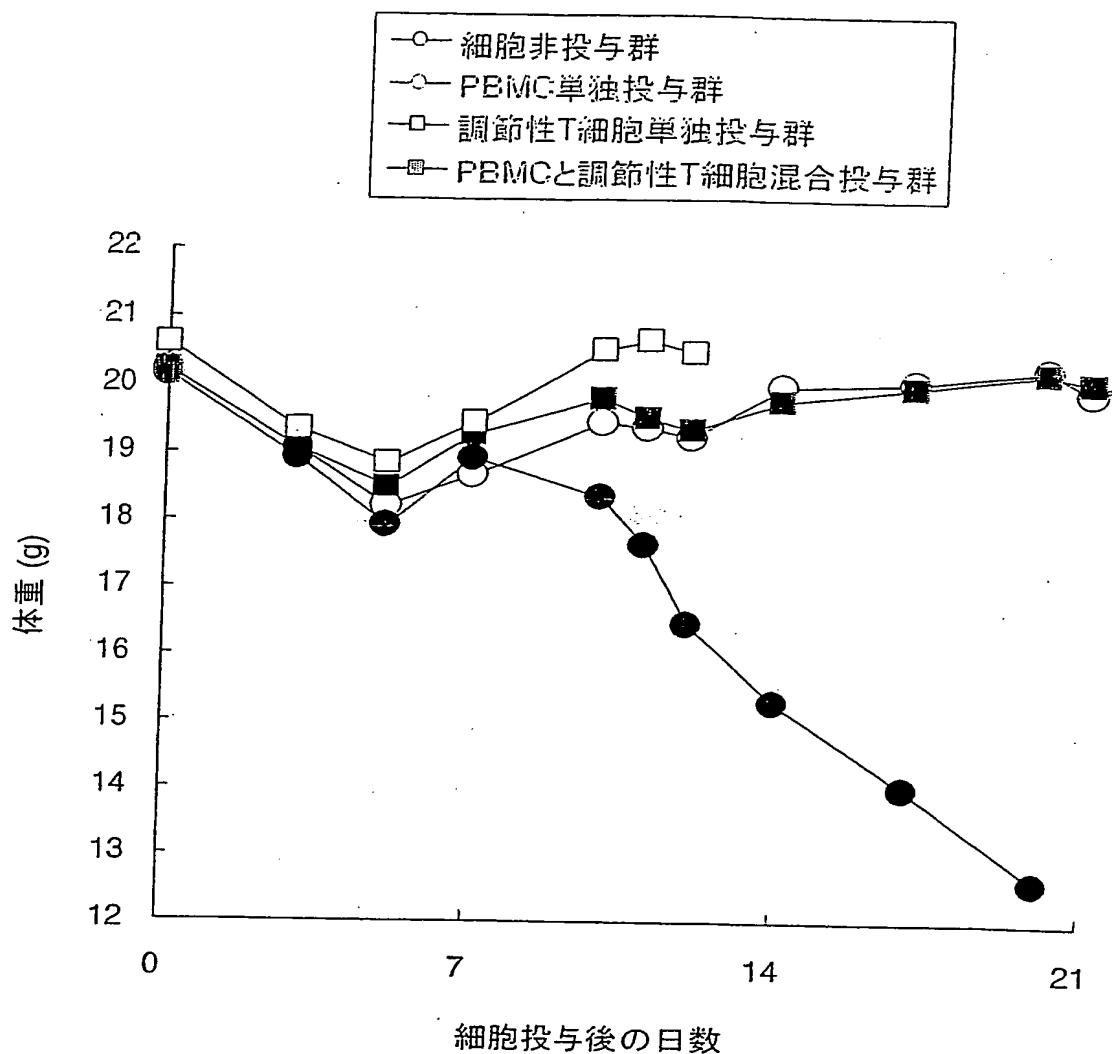
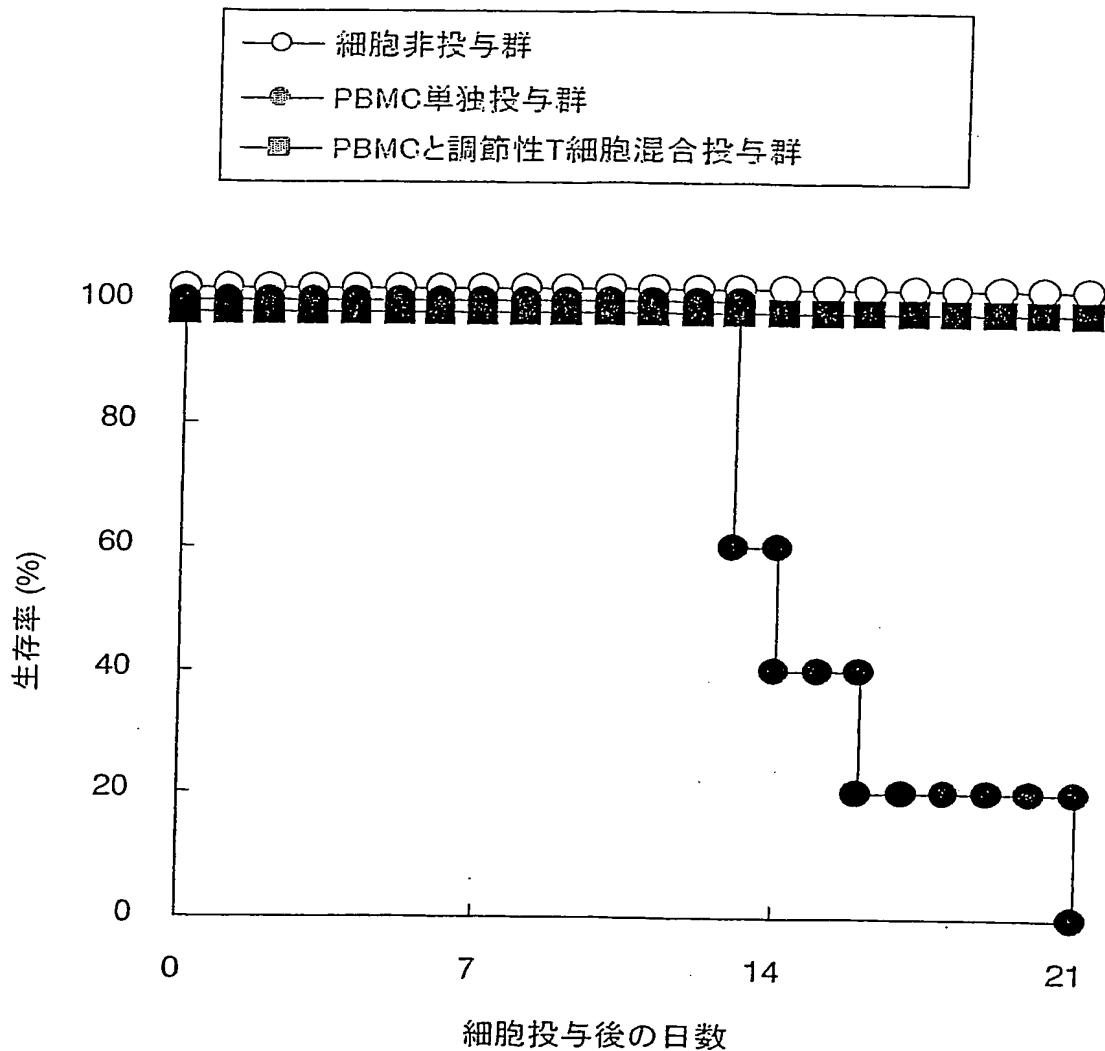
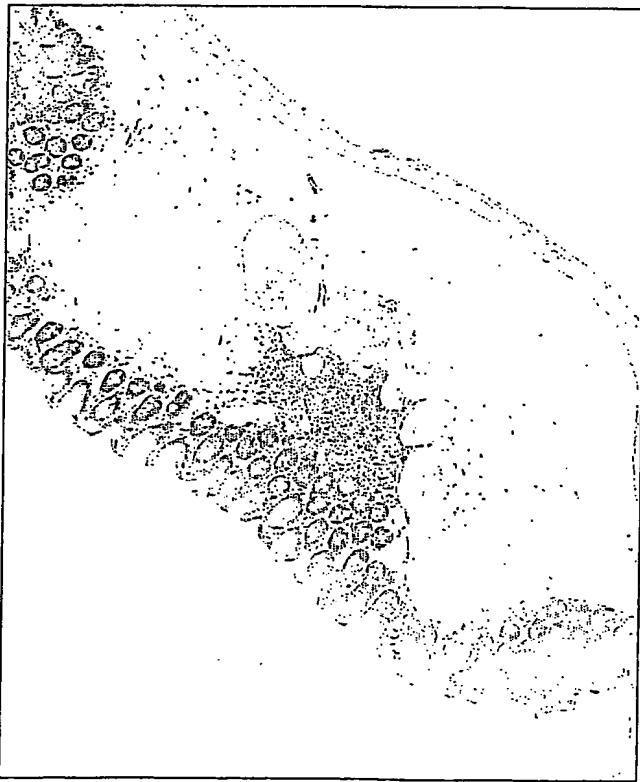


図 17



PBMCおよび調節性T細胞混合懸与群

PBMC単独投与群



■ 18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004698

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' A61K45/00, A61K39/395, A61P37/06, C07K16/18, C07K16/46,  
C12P21/08, C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' A61K45/00, A61K39/395, A61P37/06, C07K16/18, C07K16/46,  
C12P21/08, C12Q1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAP (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X P, A	JP 2003-102471 A (Kirin Brewery Co., Ltd.), 08 April, 2003 (08.04.03), Full text; Claim 6 (Family: none)	25, 26 1-11
X Y	JP 2-503514 A (Waldmann, Herman), 25 October, 1990 (25.10.90), Full text; page 3, lower right column, lines 9 to 14 & EP 328404 A1 & GB 2216126 A & US 5846534 A	1-11, 25, 26 1-11, 26

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
24 June, 2004 (24.06.04)Date of mailing of the international search report  
27 July, 2004 (27.07.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004698

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	MASUYAMA, J. et al., 'A novel costimulation pathway via the 4C8 antigen for the induction of CD4+ regulatory T cells.', J.Immunol., (2002), Vol.169, No.7, pages 3710 to 3716	25,26 1-11
X Y	WO 02/30460 A2 (ISIS INNOVATION LTD.), 18 April, 2002 (18.04.02), Full text & AU 2001/93995 B & EP 1324771 A1 & JP 2004-510827 A	25,26 1-11
X Y	WO 00/10603 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR), 02 March, 2000 (02.03.00), Full text & EP 1107789 A1 & JP 2004-503463 A	25,26 1-11
X Y	JP 2000-506723 A (ISIS INNOVATION LTD.), 06 June, 2000 (06.06.00), Full text & WO 97/31024 A1 & AU 9718851 B & EP 970127 A1 & US 2002/48578 A	25,26 1-11
A	WO 99/12972 A1 (MASUYAMA J.), 18 March, 1999 (18.03.99), Full text & EP 1013668 A1 & US 6515111 A	1-11,25,26
A	MASUYAMA, J. et al., 'Characterization of the 4C8 antigen involved in transendothelial migration of CD26 <sup>hi</sup> T cells after tight adhesion to human umbilical vein endothelial cell monolayers.', J.Exp.Med., (1999), Vol.189, No.6, pages 979 to 989; full text	1-11,25,26

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004698

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 12-24

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 12 o 24 involve methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2) (a) (i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2.  Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(See extra sheet.)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

## Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004698

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

&lt;Unity&gt;

- [1] Claims 1 to 11: (referred to as the invention group [1])
- [2] Claim 25 : (referred to as the invention group [2])
- [3] Claim 26 : (referred to as the invention group [3])

The matter specifying invention common to the invention groups [1] to [3] exclusively resides in a drug having an immunosuppressive effect. However, the following drug:

- an immunosuppressive drug containing as the active ingredient a humanized antibody of Campath-1 antibody (seemingly corresponding to "a CD52 agonist other than 4C8 antibody" as specified in the invention group [1], and to "an anti-CD52 humanized antibody usable as a drug having an immunosupprssive effect and an effect of inducing the differentiation and/or promoting the proliferation of regulatory T cells..." as specified in the invention group [2]):

is reported in the documents cited in the column C, for example;

(\*) JP 2-503514 A (Waldman and Harman) 1990.10.25, the whole document, p.3, right lower column, lines 9-14 & EP 328404 A1 & WO 89/7452 A1 & GB 2216126 A & AU 8930626 B & US 5846534 A & JP 11-228900 A

Moreover, a humanized antibody of Campath-1 and a process for producing the same are illustrated in the documents cited in the column C:

(\*) WO 02/30460 A2 (ISIS INNOVATION LTD) 2002.04.18, the whole document & AU 2001/93995 B & EP 1324771 A1 & JP 2002-510827 A

(\*) WO 00/10603 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 2000.03.02, the whole document & EP 1107789 A1 & JP 2004-503463A

(\*) JP 2000-506723A (ISIS INNOVATION LTD) 2000.06.06, the whole document & WO 97/31024 A1 & AU 9718851 B & EP 970127 A1 & US 2002/48578 A

and, therefore, had been publicly known before the priority date of the present case too.

- 4C8 antibody (seemingly corresponding to "a drug having an immunosupprssive effect and an effect of inducing the differentiation and/or promoting the proliferation of regulatory T cells...." as specified in the invention group [3])

is also reported in the documents cited in the column C, for example;

(\*) MASUYAMA, J. et al., "A novel costimulation pathway via the 4C8 antigen for the induction of CD4+ regulatory T cells" J.Immunol., (2002) vol. 169, no.7, p.3710-3716

Based on the statements in these documents, it appears that there is no special technical feature common to the invention groups [1] to [3] and thus these groups of inventions are not considered as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004698

## &lt;Statement in claims and description&gt;

Claims 1 to 9 and 11 relate to medicinal compositions for immunosuppression which contain, as the active ingredient, a compound having a desired property as "a CD52 agonist" other than 4C8 antibody. Although claims 1 to 9 and 11 involve any compounds having the property as "a CD52 agonist" as described above, only the employment of a publicly known Campth-1 antibody, among the claimed compounds, is supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning within PCT Article 5.

Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the space of the compounds having the property as "a CD52 agonist" cannot be specified. Thus, the above claims do not comply with the requirement of clearness within PCT Article 6 too.

Such being the case, the search was made mainly on the Campath-1 antibody as set forth in claim 10 which is employed in practice in the description as "a CD52 agonist" other than 4C8 antibody.

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' A61K45/00, A61K39/395, A61P37/06, C07K16/18, C07K16/46, C12P21/08, C12Q1/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' A61K45/00, A61K39/395, A61P37/06, C07K16/18, C07K16/46, C12P21/08, C12Q1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAP(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), WPI, JOIS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, A	JP 2003-102471 A (麒麟麦酒株式会社) 2003. 04. 08 請求項 6 (ファミリーなし)	文献全体、 25, 26 1-11

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

24. 06. 2004

## 国際調査報告の発送日

27. 7. 2004

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

大久保元浩

4C 8828

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C(続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2-503514 A (ワルトマン, ハーマン) 1990.10.25 文献全体、p. 3右下欄第9-14行 & EP 328404 A1 & WO 89/7452 A1 & GB 2216126 A & AU 8930626 B & US 5846534 A & JP 11-228900 A	1-11, 25, 26
X	MASUYAMA, J. et al. 'A novel costimulation pathway via the 4C8 antigen for the induction of CD4+ regulatory T cells.' J. Immunol., (2002) vol. 169 no. 7 p. 3710-3716	25, 26
A		1-11
X	WO 02/30460 A2 (ISIS INNOVATION LTD) 2002.04.18 文献全体 & AU 2001/93995 B & EP 1324771 A1 & JP 2004-510827 A	25, 26
Y		1-11
X	WO 00/10603 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 2000.03.02 文献全体 & EP 1107789 A1 & JP 2004-503463 A	25, 26
Y		1-11
X	JP 2000-506723 A (アイス・イノベーション・リミテッド) 2000.06.06 文献全体 & WO 97/31024 A1 & AU 9718851 B & EP 970127 A1 & US 2002/48578 A	25, 26
Y		1-11
A	WO 99/12972 A1 (MASUYAMA J) 1999.03.18 文献全体 & EP 1013668 A1 & US 6515111 A	1-11, 25, 26
A	MASUYAMA, J. et al. 'Characterization of the 4C8 antigen involved in transendothelial migration of CD26 <sup>hi</sup> T cells after tight adhesion to human umbilical vein endothelial cell monolayers.' J. Exp. Med., (1999) vol. 189 no. 6 p. 979-989 文献全体	1-11, 25, 26

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 12-24 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 12-24 は、治療による人体の処置方法に係る態様を含むものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(特別ページ参照)

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## &lt;单一性について&gt;

- [1] 請求の範囲 1-11 … (発明群[1]とする)
- [2] 請求の範囲 2-5 … (発明群[2]とする)
- [3] 請求の範囲 2-6 … (発明群[3]とする)

発明群[1]-[3]の間で共通する発明特定事項は、免疫抑制効果を奏する薬剤という点のみであるが、

・ C a m p a t h - 1 抗体のヒト化抗体（これは発明群[1]規定の「4 C 8 抗体以外の CD 5 2 アゴニスト」に相当すると認められるし、発明群[2]規定の「免疫抑制効果、調節性 T 細胞の分化誘導および／もしくは増殖促進…効果を有する薬剤となる、抗 CD 5 2 ヒト化抗体」に相当すると認められる）を有効成分とする免疫抑制剤

は、C欄で引用された文献中の例えれば

(\*) JP 2-503514 A (ワルドマン, ハーマン) 1990.10.25 文献全体、p.3右下欄第9-14行 & EP 328404 A1 & WO 89/7452 A1 & GB 2216126 A & AU 8930626 B & US 5846534 A & JP 11-228900 A

に記載されているし、その他にも C a m p a t h - 1 のヒト化抗体及びその作製法は、C欄で引用された文献中の

(\*) WO 02/30460 A2 (ISIS INNOVATION LTD) 2002.04.18 文献全体  
& AU 2001/93995 B & EP 1324771 A1 & JP 2004-510827 A  
(\*) WO 00/10603 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 2000.03.02  
文献全体 & EP 1107789 A1 & JP 2004-503463 A  
(\*) JP 2000-506723 A (アイシス・イノベーション・リミテッド) 2000.06.06 文献全体 & WO 97/31024 A1 & AU 9718851 B & EP 970127 A1 & US 2002/48578 A

のいずれかに例示されるように、これまた本願優先日前既知のものであるし、

・ 4 C 8 抗体（これは発明群[3]規定の「免疫抑制効果、調節性 T 細胞の分化誘導および／もしくは増殖促進…効果を有する薬剤」に相当すると認められる）

もまた、C欄で引用された文献中の、例えば

(\*) MASUYAMA, J. et al. 'A novel costimulation pathway via the 4C8 antigen for the induction of CD4+ regulatory T cells.' J. Immunol., (2002) vol.169 no.7 p.3710-3716

に記載されている。

これらの文献の記載を踏まえれば、発明群[1]-[3]は、特別な技術的特徴を共有しているとはいえないから、单一の一般的発明概念を形成するように連関しているとは認められない。

## &lt;請求の範囲・明細書の記載について&gt;

請求の範囲1-9, 11は、4C8抗体以外の「CD52アゴニスト」なる、所望の性質により定義された化合物を有効成分として含有する免疫抑制のための医薬組成物に関するものである。そして、請求の範囲1-9, 11は、上記「CD52アゴニスト」として、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、4C8抗体を除けば、クレームされた化合物のうち、公知のCampath-1抗体を採用した例のみに過ぎない。

また、「CD52アゴニスト」については、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、上記各請求の範囲は、PCT6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は主として、4C8抗体以外で「CD52アゴニスト」として明細書中で具体的に採用されている、請求の範囲10規定のCampath-1抗体について行った。